

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 12 月 27 日 (27.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/98494 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12,
C07K 14/47, C12N 1/21, C07K 16/18, G01N 33/53,
33/50, 33/15, C12P 21/02, 21/08, A61K 31/711, 38/17,
A01K 67/027, A61P 1/14, 3/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05257

(22) 国際出願日: 2001 年 6 月 20 日 (20.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-191089 2000 年 6 月 21 日 (21.06.2000) JP
特願2000-275013 2000 年 9 月 6 日 (06.09.2000) JP
特願2001-116000 2001 年 4 月 13 日 (13.04.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森 正明 (MORI,
Masaaki) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日3丁
目8番地5 Ibaraki (JP). 下村行生 (SHIMOMURA, Yukio)
[JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代3丁目12番地

1 武田松代レジデンス410号 Ibaraki (JP). 原田美穂子
(HARADA, Mioko) [JP/JP]; 〒305-0046 茨城県つくば
市東2丁目14番地5 仕黒マンション201号 Ibaraki (JP).
栗原美香 (KURIHARA, Mika) [JP/JP]; 〒565-0823 大
阪府吹田市山田南50番1号 武田薬品吹田寮内 Osaka
(JP). 北田千恵子 (KITADA, Chieko) [JP/JP]; 〒590-0073
大阪府堺市南向陽町1丁目2番8号 Osaka (JP). 浅見泰
司 (ASAMI, Taiji) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば
市千現2丁目12番地14 Ibaraki (JP). 松本芳男 (MAT-
SUMOTO, Yoshio) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば
市松代3丁目12番地1 武田松代レジデンス511号 Ibaraki
(JP). 安達由佳 (ADACHI, Yuka) [JP/JP]; 〒305-0035 茨
城県つくば市松代3丁目12番地1 武田松代レジデ
ンス610号 Ibaraki (JP). 渡辺卓也 (WATANABE, Takuya)
[JP/JP]; 〒532-0033 大阪府大阪市淀川区新高6丁目
14番9-B904号 Osaka (JP). 周郷 司 (SUGO, Tsukasa)
[JP/JP]; 〒300-3261 茨城県つくば市花畑2丁目7番地26
号 テクノタウン筑波301 Ibaraki (JP). 阿部理子 (ABE,
Michiko) [JP/JP]; 〒300-1252 茨城県稲敷郡茎崎町高
見原4丁目3番15 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 小林純子, 外 (KOBAYASHI, Sumiko et al.);
〒104-0028 東京都中央区八重洲2丁目8番7号 福岡ビ
ル9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

[続葉有]

(54) Title: LIGAND TO GPR8 AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: GPR8に対するリガンドおよびそのDNA

(57) Abstract: A ligand to GPR8, its DNA, etc. More particularly speaking, a polypeptide capable of binding to GPR8 or its amide or ester or salts thereof, DNA thereof, etc. are provided. The ligand to GPR8 as described above is useful in developing a receptor-binding assay system with the use of a GPR8 expression system, screening candidate compounds for drugs such as preventives and remedies for obesity, appetite stimulating agents and prolactin production inhibitors, etc.

(57) 要約:

本発明はGPR8に対するリガンドおよびそのDNA等の提供、具体的にはGPR8と結合する能力を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩およびそのDNAなどの提供を目的とする。

本発明のGPR8に対するリガンドは、GPR8の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発、肥満症などの予防・治療剤、食欲増進剤、プロラクチン産生抑制剤などの医薬品候補化合物のスクリーニングなどに有用である。

WO 01/98494 A1



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

G P R 8 に対するリガンドおよびそのDNA

5 技術分野

本発明は脳由来の新規ポリペプチドおよびそれをコードするDNA、更には該新規ポリペプチドを用いた医薬のスクリーニング方法、好ましくは、本発明の新規ポリペプチドの受容体であるG P R 8 (O'Dowd, B.F. et al., Genomics, 28巻, 84-91, 1995年) と本発明の新規ポリペプチドの両者を用いた医薬（食欲（摂食
10 ）増進剤、抗肥満剤等）のスクリーニング、該スクリーニングによって得られる化合物などに関する。

背景技術

生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環
15 器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節、感覚受容などの重要な機能調節は、様々なホルモンや神経伝達物質のような内在性因子あるいは光や匂いなどの感覚刺激をこれらに対して生体が備えている細胞膜に存在する特異的な受容体を介して細胞が受容し、それに応じた反応をすることによって行われている。このような機能調節によるホルモンや神経伝達物質の受容体の多くはguanine nucleotide-b
20 inding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）と共役しており、このG蛋白質の活性化によって細胞内にシグナルを伝達して様々な機能を発現させることを特徴とする。また、これらの受容体蛋白質は共通して7個の膜貫通領域を有する。これらのことからこうした受容体はG蛋白質共役型受容体あるいは7回膜貫通型受容体と総称される。このように生体機能の調節には様々なホルモンや
25 神経伝達物質およびそれに対する受容体蛋白質が存在して相互作用し、重要な役割を果たしていることがわかっているが、未知の作用物質（ホルモンや神経伝達物質など）およびそれに対する受容体が存在するかどうかについてはいまだ不明なことが多い。

近年、ヒトゲノムDNAあるいは各種ヒト組織由来のcDNAのランダムな配

列決定による配列情報の蓄積および遺伝子解析技術の急速な進歩によってヒトの遺伝子が加速度的に解明されてきている。それにともない、機能未知の蛋白をコードすると予想される多くの遺伝子の存在が明らかになっている。G蛋白質共役型受容体は、7個の膜貫通領域を有するのみでなくその核酸あるいはアミノ酸に
5 多くの共通配列が存在するためそのような蛋白の中から明確にG蛋白質共役型受容体として区分することができる。一方でこうした構造の類似性を利用したポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する) 法によってもこうしたG蛋白質共役型受容体遺伝子が得られている。このようにしてこれまでに得られたG蛋白共役型受容体のうちには既知の受容
10 体との構造の相同性が高いサブタイプであって容易にそのリガンドを予測することが可能な場合もあるが、ほとんどの場合その内在性リガンドは予測不能であり、これらの受容体は対応するリガンドがほとんど見い出されていない。これより、これらの受容体はオーファン受容体と呼ばれている。このようなオーファン受容体の未同定の内在性リガンドは、リガンドが知られていなかったために十分な
15 解析がなされていなかった生物現象に関与している可能性がある。そして、このようなリガンドが重要な生理作用や病態と関連している場合には、その受容体作動薬あるいは拮抗薬の開発が革新的な医薬品の創製に結びつくことが期待される (Stadel, J. et al., TiPS, 18巻、430-437頁、1997年、Marchese, A. et al., TiPS, 20巻、370-375頁、1999年、Civelli, O. et al., Brain Res., 848巻、6
20 3-65頁、1999年)。しかし、これまで実際にオーファンG蛋白質共役型受容体のリガンドを同定した例はそれほど多くない。

最近、幾つかのグループによってこうしたオーファン受容体のリガンド探索の試みがなされ、新たな生理活性ペプチドであるリガンドの単離・構造決定が報告されている。ReinsheidらおよびMeunierらは独立に、動物細胞にオーファンG蛋白質共役型受容体LC132あるいはORL1をコードするcDNAを導入して
25 受容体を発現させ、その応答を指標としてorphanin FQあるいはnociceptinと名付けられた新規ペプチドをブタ脳あるいはラット脳の抽出物より単離し、配列を決定した (Reinsheid, R. K. et al., Science, 270巻、792-794頁、1995年、Meunier, J.-C. et al., Nature, 377巻、532-535頁、1995年)。このペプチドは痛覚

に関与していることが報告されたが、さらに、受容体のノックアウトマウスの研究により記憶に関与していることが明らかにされた (Manabe, T. et al., *Nature*, 394巻、577-581頁、1998年)。

その後これまでにPrRP (prolactin releasing peptide)、orexin、apelin、ghrelinおよびGALP (galanin-like peptide) などの新規ペプチドがオーファンG
5 蛋白質共役型受容体のリガンドとして単離された (Hinuma, S. et al., *Nature*、393巻、272-276頁、1998年、Sakurai, T. et al., *Cell*、92巻、573-585頁、1998年、Tatemoto, K. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、251巻、471-476頁、1998年、Kojima, M. et al., *Nature*、402巻、656-660頁、1999年、Ohtaki
10 , T. et al., *J. Biol. Chem.*、274巻、37041-37045頁、1999年)。一方、これまで明らかでなかった生理活性ペプチドの受容体が解明された例もある。腸管収縮に関与するmotilinの受容体がGPR38であることが明らかにされた (Feighner, S. D. et al., *Science*、284巻、2184-2188頁、1999年) ほか、SLC-1がMCHの受容体として同定され (Chambers, J. et al., *Nature*、400巻、261-265頁、1999年、Saito, Y. et al., *Nature*、400巻、265-269頁、1999年、Shimomura, Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、261巻、622-626頁、1999年、Lembo, P. M. C. et al., *Nature Cell Biol.*、1巻、267-271頁、1999年、Bachner, D. et al., *FEBS Lett.*、457巻、522-524頁、1999年)、またGPR14 (SENRL) がurotensin IIの受容体であることが報告された (Ames, R. S. et al., *Nature*、401巻、282-286頁、1999年、Mori, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、265巻、123-129頁、1999年、Nothacker, H. P. et al., *Nature Cell Biol.*、1巻、383-385頁、1999年、Liu, Q. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、266巻、174-178頁、1999年)。MCHはそのノックアウトマウスが羸瘦のphenotypeを示すことから肥満に関与することが示されていたが (Shimada, M. et al., *Nature*、396巻、670-674頁、1998年)、その受容体が明らかにされたことにより抗肥満剤としての可能性を有する受容体拮抗薬の探索が可能となった。また、urotensin IIはサルに静脈内投与することによって心虚血を惹起することから心循環系に強力な作用を示すことも報告されている (Ames, R. S. et al., *Nature*、401巻、282-286頁、1999年)。

このように、オーファン受容体およびそのリガンドは新たな生理作用に関与する場合が多く、その解明は新たな医薬品開発に結びつくことが期待される。しかし、オーファン受容体のリガンド探索においては多くの困難さが伴うことが知られている。例えば、細胞に発現させたオーファン受容体がりガンドに応答した後
5 にいかなる 2 次情報伝達系が作動するかは一般に不明であり、様々な応答系について検討する必要がある。また、リガンドの存在する組織は容易には予想されないため種々の組織抽出物を用意しなければならない。さらに、リガンドがペプチドである場合、受容体を刺激するのに必要なリガンド量はごく低濃度で十分であるためにこのようなりガンドの生体内の存在量は極微量であることが多いことに
10 加え、ペプチドは蛋白分解酵素によって消化されて活性を失ったり、非特異的吸着によって精製過程において回収が悪かったりするために、生体より抽出して構造決定に必要な量を単離することは通常極めて困難である。これらの問題によって、これまでに数多くのオーファン受容体の存在が明らかにされながらそのリガンドが明らかにされた受容体はごく一部に過ぎない。

15

発明の開示

オーファン G 蛋白質共役型受容体として報告されているものの一つに G P R 8 がある (O'Dowd, B. F. et al., Genomics, 28 巻, 84-91 頁, 1995 年)。 G P R 8 はソマトスタチン受容体 (S S T R 3) およびオピオイド受容体 (δ , κ およ
20 び μ) と低いホモロジーがあるが、そのリガンドが何であるのかはこれまで不明であった。

従って、G P R 8 の内因性リガンドを見出し、該リガンドを直接利用する、または該リガンド (好ましくは G P R 8 と組み合わせて) を用いた医薬のスクリーニング系を利用することによって今までにない全く新規な作用機序を有する医薬
25 の開発が望まれていた。

本発明者たちは上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ブタ視床下部抽出物より、G P R 8 と結合する内因性リガンドを見出し、精製することに成功した。さらに該リガンドのヒト型ホモログのクローニングに成功し、該リガンドが食欲 (摂食) 増進作用を有すること、G P R 8 アゴニストが食欲 (摂食)

増進剤、GPR 8 アンタゴニストが肥満症の予防・治療剤（抗肥満薬・抗肥満剤）になること等を見出した。これらの知見に基づいて、発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- 5 （１）配列番号：４で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩と結合する能力を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- （２）配列番号：１６で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくは
- 10 はそのエステルまたはその塩、
- （３）配列番号：１６で表されるアミノ酸配列を有する上記（２）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- （４）実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：６、配列番号：１７、配列番号：２０、配列番号：２１、配列番号：２２、配列番号：２３、配列番号：２４、
- 15 配列番号：２５、配列番号：５６、配列番号：５７、配列番号：７３、配列番号：７４、配列番号：９１、配列番号：９２、配列番号：９５、配列番号：９６、配列番号：９７、配列番号：９８、配列番号：９９、配列番号：１００、配列番号：１０１、配列番号：１０２、配列番号：１０３、配列番号：１０４、配列番号：１０５、配列番号：１０６、配列番号：１０７、配列番号：１０８、配列番号：１０９、配列番号：１１０、配列番号：１１１、配列番号：１１２または配列番号：１１３で表されるアミノ酸配列である上記（２）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 20 （５）配列番号：１５、配列番号：４２、配列番号：５５、配列番号：７２または配列番号：９０で表されるアミノ酸配列を含有する上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 25 （６）上記（１）記載のポリペプチドをコードするDNAを含有するDNA、
- （７）配列番号：１８、配列番号：１９、配列番号：２６、配列番号：２７、配列番号：２８、配列番号：２９、配列番号：３０、配列番号：３１、配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：７５、配列番号：７６、配列番号：９３、配

- 列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124または配列番号：125で表される塩基配列を有する上記（6）記載のDNA、
- 5 （8）配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表される塩基配列を有する上記（6）記載のDNA、
- （9）上記（6）記載のDNAを含有する組換えベクター、
- （10）上記（9）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
- （11）上記（10）記載の形質転換体を培養し、上記（1）記載のポリペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、
- 10 （12）上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、
- （13）上記（6）記載のDNAまたは上記（12）記載の抗体を含有してなる
- 15 診断薬、
- （14）上記（6）記載のDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA、
- （15）上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる組成物（例、医薬、動物薬、農薬、食品等）、
- 20 （16）上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、
- （17）上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる食欲増進剤、
- （18）上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなるプロラクチン産生促進剤、
- 25 （19）上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(20) 標識した上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる上記(19)記載のスクリーニング方法、

(21) さらに、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその塩、または該蛋白質の部分ペ
5 プチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(19)記載のスクリーニング方法、

(22) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物または
10 その塩のスクリーニング用キット、

(23) さらに、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその塩、または該蛋白質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記(22)記載のスクリーニング用キット、

(24) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(22)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、
15

(25) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(22)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、
20

(26) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(22)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる抗肥満剤、

(27) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(22)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる食欲増進剤、
25

(28) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(22)記載のスクリーニング用キットを用いて得られるプロラクチン産生抑制剤、

(29) 哺乳動物に対し、上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドも

しくはそのエステルまたはその塩の有効量を投与することを特徴とする食欲増進方法、

5 (30) 哺乳動物に対し、上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(22)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする肥満の予防治療方法、

(31) 食欲増進剤を製造するための、上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の使用、

10 (32) 抗肥満剤を製造するための、上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(22)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の使用、

(33) 上記(6)記載のDNAを用いることを特徴とするトランスジェニック動物、

15 (34) 上記(9)記載の組換えベクターにより動物に導入されることを特徴とする上記(33)記載のトランスジェニック動物、

(35) 動物が非ヒト哺乳動物である上記(33)記載のトランスジェニック動物、

(36) 上記(6)記載のDNAが不活性化されたノックアウト動物、

20 (37) 上記(6)記載のDNAが他の遺伝子の導入により不活性化された上記(36)記載のノックアウト動物、

(38) 他の遺伝子がレポーター遺伝子である上記(37)記載のノックアウト動物。

25 (39) 動物が非ヒト哺乳動物である上記(36)記載のノックアウト動物、および

(40) 上記(33)または上記(36)記載の動物を用いることを特徴とする上記(6)記載のDNAの欠損・損傷に起因する疾病に対して効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法などに関する。

さらには、本発明は、

(4 1) 配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列と約9 0 %以上、好ましくは約9 5 %以上、さらに好ましくは約9 8 %以上の相同性を有するアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(4 2) 配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および

(4 3) 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩と特異的に結合する能力を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などを提供する。

図面の簡単な説明

図1はヒトGPR8受容体蛋白質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるヒトGPR8受容体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

図2はWakosil-II 3C18HGカラムを用いたGPR8リガンドの最終段階の精製におけるHPLCのUV吸収と各ピークのGTPγS活性を示す。活性は矢印に示すピークに回収された。

図3は種々の濃度の23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのC

HO/GPR8細胞膜画分に対するGTPγS結合促進活性を示す。

図4は種々の濃度の30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのC
HO/GPR8細胞膜画分に対するGTPγS結合促進活性を示す。

図5は種々の濃度の23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのC
5 HO/GPR8細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す。

図6はGPR8リガンドペプチドの摂食量に対する作用を示す。各値は平均値
±SEMを示す(n=10)。

図7は種々の濃度の30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのC
HO/GPR8細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す。

10 図8はGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ前駆体蛋白質cDNAの全塩
基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ前駆
体受容体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8リガン
ドのヒトホモログペプチドの配列を□で示す。

図9はGPR8リガンドペプチドのブタホモログ前駆体蛋白質cDNAの全塩
15 基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのブタホモログ前駆
体受容体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8リガン
ドのブタホモログペプチドの配列を□で示す。

図10はGPR8リガンドペプチドのラットホモログ前駆体蛋白質cDNAの
全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのラットホモロ
20 グ前駆体受容体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8
リガンドのラットホモログペプチドの配列を□で示す。

図11はGPR8リガンドペプチドのマウスホモログ前駆体蛋白質cDNAの
全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのマウスホモロ
グ前駆体受容体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8
25 リガンドのマウスホモログペプチドの配列を□で示す。

図12はヒトGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を用いた、^[125]I
]で標識した23残基のヒトGPR8リガンドに対する23残基のヒトGPR8
リガンドの結合阻害活性を示す図を示す。

図13はラット脳室内投与したGPR8リガンドペプチドによる血中プロラク

チン量増加を示す図を示す。各値は平均値±SEMを示す。

発明を実施するための形態

本発明の「配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
5 のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩と結合する能力を有するポリペプ
チドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩」としては、例えば
、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸
配列を含有する蛋白質またはその塩との結合の解離定数が1 nM以下、好ましく
は200 pM以下、さらに好ましくは100 pM以下、特に好ましくは80 pM
10 以下、最も好ましくは50 pM以下であるポリペプチドもしくはそのアミドもし
くはそのエステルまたはその塩などが挙げられる。

本発明の配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同
一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する
場合がある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワ
15 トリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝
細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細
胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細
胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチ
ュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑
20 膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間
質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそ
れらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球
、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄
、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚
25 、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末
梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系
の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2
、WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-
3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jur

k a t, C C R T-H S B-2, K E-3 7, S K W-3, H U T-7 8, H U T-1 0 2, H 9, U 9 3 7, T H P-1, H E L, J K-1, C M K, K O-8 1 2, M E G-0 1 など) に由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

- 5 配列番号：1 6 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1 6 で表わされるアミノ酸配列と約 9 0 % 以上、好ましくは約 9 5 % 以上、より好ましくは約 9 8 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：1 6 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配
10 列としては、上記のアミノ酸配列の他、

- (i) 配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列中の 1 ~ 5 個（好ましくは 1 ~ 3 個、さらに好ましくは 1 ~ 2 個、より好ましくは、1 個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、
(ii) 配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列に 1 ~ 5 個（好ましくは 1 ~ 3 個、
15 さらに好ましくは 1 ~ 2 個、より好ましくは、1 個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、
(iii) 配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列に 1 ~ 5 個（好ましくは 1 ~ 3 個、さらに好ましくは 1 ~ 2 個、より好ましくは、1 個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、
20 (iv) 配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列中の 1 ~ 5 個（好ましくは 1 ~ 3 個、さらに好ましくは 1 ~ 2 個、より好ましくは、1 個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、
(v) 上記 (i) ~ (iv) を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

- 本発明の配列番号：1 6 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸
25 配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：1 6 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1 6 で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの有する活性（

例えば、後述の疾患の予防・治療活性、受容体との結合活性、受容体発現細胞に対する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP γ S 結合活性などを促進する活性等））などがあげられる。

実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。

配列番号：16 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号：6、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：56、配列番号：57、配列番号：73、配列番号：74、配列番号：91、配列番号：92、配列番号：95、配列番号：96、配列番号：97、配列番号：98、配列番号：99、配列番号：100、配列番号：101、配列番号：102、配列番号：103、配列番号：104、配列番号：105、配列番号：106、配列番号：107、配列番号：108、配列番号：109、配列番号：110、配列番号：111、配列番号：112 または配列番号：113 で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：16 で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：6 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：17 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：20 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：21 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：23 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：24 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：25 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：56 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：57 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：73 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：74 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：91 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列

番号：92で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：95で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：96で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：97で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：98で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：99で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：100で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：101で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：102で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：103で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：104で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：105で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：106で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：107で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：108で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：109で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：110で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：111で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：112で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号：113で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどのGPR8と特異的に結合する能力を有するポリペプチドがあげられる。

また、本発明のポリペプチドは、後述の本発明の受容体（GPR8）との結合活性、本発明の受容体発現細胞に対する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性などを促進する活性等）等を有するポリペプチドのみならず、該結合活性または細胞刺激活性を有するポリペプチドの前駆体ポリペプチドをも包含する意味で用いられる。

該結合活性または細胞刺激活性を有するポリペプチドの前駆体ポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：15で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド等があげられる。

より、具体的には、

配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが
5 あげられる。

特に、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列の他、

- (i) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠
10 失したアミノ酸配列、
- (ii) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列に1～100個（好ましくは1～50個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、
- (iii) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10
15 0個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、
- (iv) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、
- 20 (v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号：42、配列番号：55、配列番号：72または配列番号：90で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

上記前駆体ポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：15で表わ
25 されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：42で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：55で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：72で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号：90で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどがあげられる。

本発明のポリペプチドに対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明のポリペプチドと結合活性を有し、本発明のポリペプチドにより該受容体発現細胞の細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTPγS 結合活性などを促進する活性等）が観察されるものなどがあげられる。

具体的には、オーファン G 蛋白質共役型受容体である GPR8 (O'Dowd, B. F. et al., Genomics, 28 巻, 84-91 頁, 1995 年; 配列番号: 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質)、または、GPR8 と実質的に同一のアミノ酸配列、即ち、配列番号: 4 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質などがあげられる。

本発明の配列番号: 4 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質（以下、本発明の受容体と称する場合がある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-

4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCR T-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H 9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)に由来する蛋白質であってもよく、合成蛋白質であってもよい。

- 5 配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列
10 としては、上記のアミノ酸配列の他、

(i) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個
15 、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10
20 個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

本発明のポリペプチドに対する受容体の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペ
25 プチドと称する場合がある）としては、後述の医薬等のスクリーニング方法に用いることのできる部分ペプチドであれば、いかなるものであってもよいが、好ましくは、本発明のポリペプチドに対する結合能を有する部分ペプチド、細胞膜外領域に相当するアミノ酸配列を含有する部分ペプチド等が用いられる。

具体的には、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中、1番目(Met)～1

23番目 (P h e)、301番目 (A s n) ~ 358番目 (L y s)、548番目 (T y r) ~ 593番目 (A r g) および843番目 (A l a) ~ 895番目 (I l e) で表される部分アミノ酸配列から選択される1または2以上の部分アミノ酸配列を含有する部分ペプチドなどがあげられる。

- 5 本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端 (アミノ末端)、右端がC末端 (カルボキシル末端) である。配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基 ($-COOH$) またはカルボキシレート ($-COO^-$) であるが、C末端がアミド ($-CONH_2$)
10) またはエステル ($-COOR$) であってもよい。

- ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。
- 15

- 本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート) を有している場合、カルボキシル基がアミ
20 ド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドには、N末端のアミノ酸残基 (例、メチオニン残基) のアミノ基が保護基 (例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など) で保護され
25 ているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基 (例えば $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など) が適当な保護基 (例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など) で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白

質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のポリペプチド、受容体、その部分ペプチド、もしくはそれらの塩、またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィ

ド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、受容体、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタ

ロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチ
オイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、
5 プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプ
チル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状ア
ルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-
ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジル
エステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキ
シカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒ
10 ドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護する
ことができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低
級（ C_{1-6} ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシ
カルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いら
15 れる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒド
ロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、 Cl_2 -Bzl、2-
ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3
20 ,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Tr
t、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水
物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,
4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール
25 、パラニトロフェノール、HONB、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタル
イミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化され
たものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素な
どの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタ

ンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール

類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

5 本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは受容体の部分ペプチドについては、受容体を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

- ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- 15 ②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- 20 ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドが遊離体である場合は、

25 公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコー

ドする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

- 5 ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。
- 10 本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば①配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124または配列番号：125で表わされる塩基配列を含有するDNA、②配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124または配列番号：125で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするDNA、③配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列を含有するDNA、または④配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を

有するDNAなどであれば何れのものでもよい。

配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124または配列番号：125、または配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124または配列番号：125、または配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の

場合が最も好ましい。

より具体的には、

- 5 (i) 配列番号：16で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (ii) 配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：19で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- 10 (iii) 配列番号：20で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：26で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (iv) 配列番号：21で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：27で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- 15 (v) 配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：28で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (vi) 配列番号：23で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：29で表わされる塩基配列を含有するDNAな
- 20 20 (vii) 配列番号：24で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：30で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (viii) 配列番号：25で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：31で表わされる塩基配列を含有するDNA
- 25 25 (ix) 配列番号：56で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：58で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- (x) 配列番号：57で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：59で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (xi) 配列番号：73で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：75で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (xii) 配列番号：74で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：76で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- 10 (xiii) 配列番号：91で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：93で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (xiv) 配列番号：92で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：94で表わされる塩基配列を含有するDNA
- 15 などが用いられ、
- (xv) 配列番号：95で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (xvi) 配列番号：96で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：114で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- 20 (xvii) 配列番号：97で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：115で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- 25 (xviii) 配列番号：98で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：116で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (xix) 配列番号：99で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：117で表わされる塩基配列を含有するDNA

Aなどが用いられ、

(xx) 配列番号: 1 0 0 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 1 1 8 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- 5 (xxi) 配列番号: 1 0 1 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 1 1 9 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxii) 配列番号: 1 0 2 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 1 2 0 で表わされる塩基配列を含有するD

- 10 NAなどが用いられ、

(xxiii) 配列番号: 1 0 3 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 5 8 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- 15 (xxiv) 配列番号: 1 0 4 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 7 5 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxv) 配列番号: 1 0 5 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 1 8 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- 20 (xxvi) 配列番号: 1 0 6 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 1 8 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxvii) 配列番号: 1 0 7 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 1 2 1 で表わされる塩基配列を含有する

- 25 DNAなどが用いられ、

(xxviii) 配列番号: 1 0 8 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 1 2 2 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxix) 配列番号: 1 0 9 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコ

ードするDNAとしては、配列番号：1 2 3で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxx) 配列番号：1 1 0で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：1 2 4で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxxi) 配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：1 2 5で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxxii) 配列番号：1 1 1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：1 2 1で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxxiii) 配列番号：1 1 2で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：1 8で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxxiv) 配列番号：1 1 3で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：1 2 1で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の受容体をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3 2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：3 2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の受容体と実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

配列番号：3 2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：3 2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al.,

Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

- 5 ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

- 10 より具体的には、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：32で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 15 本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の受容体の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

- 20 本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：32で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：32で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の受容体と実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：32で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

- 25 ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

また、本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしてより具体的には、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中、1番目(Met)～123番目(Phe)、301番目(Asn)～358番目(Lys)、548番目(Tyr

）～593番目（A r g）および843番目（A l a）～895番目（I l e）
で表される部分アミノ酸配列から選択される1または2以上の部分アミノ酸配列
を含有する部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA
、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列
5 を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAは
、公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化され
たもの、蛍光標識されたもの（例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識）、
ビオチン化されたものまたは酵素標識されたものなどがあげられる。

10 本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチド（以下、これらポリペ
プチド等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これ
らポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある）を完全に
コードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分
塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて公知のPCR法によって増幅す
15 るか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部
あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したも
のとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼ
ーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning
）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の
20 方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場
合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express K
m（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gap
ped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行
25 なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、ま
たは所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用すること
ができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、
また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有し

ていてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、
10 λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trp
20 pプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfr

と略称する場合がある) 遺伝子〔メソトレキセート (MTX) 耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子 (以下、 Amp^{r} と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、 Neo^{r} と略称する場合がある、G418 耐性) 等があげられる。特に、 dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて dhfr 遺伝子
5 を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドの N 末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場
10 合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードする DNA を含有す
15 るベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデ
20 ミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60 巻, 160 (1968)〕, JM103〔ヌクレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9 巻, 309 (1981)〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)〕, 120 巻, 517 (1978)〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41 巻, 459 (1969)〕, C600〔ジ
25 エネティックス (Genetics), 39 巻, 440 (1954)〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114〔ジーン, 24 巻, 255 (1983)〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95 巻, 87 (1

984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC15913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

15 昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Meth

ods in Enzymology) , 194巻, 182-187 (1991) 、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 5 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology, 6, 47-55 (1988)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

- 15 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、
20 無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

- エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
25 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方

法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

10 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

20 かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

25 なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

本発明のポリペプチドに対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまた

はその塩に対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

5 〔モノクローナル抗体の作製〕

 (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

 本発明のポリペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを
10 投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

 モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、
15 例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定す
20 ることにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1な
25 どの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド（蛋白質）抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。
- 10 モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。
- 20

（b）モノクローナル抗体の精製

- モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。
- 25

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造

することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

5 温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンや
10 ウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

15 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、
20 好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

25 本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNA（以下、これらのDNAをアンチセンスDNAと略記する場合がある）としては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得

る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

以下に、①本発明のポリペプチド、②本発明のDNA、③本発明の抗体、および④アンチセンスDNAの用途を説明する。

（1）本発明のポリペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のポリペプチドは後述の実施例5～8、20～23、64などに示すとおり、GPR8（本発明の受容体）発現細胞の細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性等）を有し、GPR8（本発明の受容体）の内因性リガンドである。

従って本発明のポリペプチドまたは本発明のDNAに異常があったり、欠損している場合、または本発明の受容体または該受容体をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合には、例えば、拒食症、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリ

- コバクター・ピロリ感染症，肝不全，A型肝炎，B型肝炎，C型肝炎，肝炎，単
純ヘルペスウイルス感染症，水痘帯状疱疹ウイルス感染症，ホジキン病，エイズ
感染症，ヒトパピローマウイルス感染症，高カルシウム血症，高コレステロール
血症，高グリセリド血症，高脂血症，感染症，インフルエンザ感染症，インシュ
5 リン依存性糖尿病（I型），侵襲性ブドウ球菌感染症，悪性黒色腫，がん転移
，多発性骨髄腫，アレルギー性鼻炎，腎炎，非ホジキン性リンパ腫，インシュリ
ン非依存性糖尿病（II型），非小細胞肺癌，臓器移植，骨関節炎，骨軟化症，
骨減少症，骨粗鬆症，卵巣がん，骨ペーチェット病，消化性潰瘍，末梢血管疾患
，前立腺がん，逆流性食道炎，腎不全，リウマチ関節炎，精神分裂症，敗血症，
10 敗血症ショック，重症全身性真菌感染症，小細胞肺癌，脊髄損傷，胃がん，全
身性エリテマトーサス，一過性脳虚血発作，結核，心弁膜症，血管性／多発梗塞
痴呆，創傷治癒，不眠症，関節炎，下垂体ホルモン分泌不全〔例、プロラクチン
分泌不全（例、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、更年期障害、甲状腺機能低下等
）〕、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等（特に拒食症等）の種々の疾病が発
15 症する可能性が高い。

従って、本発明のポリペプチド、本発明のDNAは、例えば、上記の種々の疾
病（特に拒食症）の治療・予防剤などの医薬（特に、食欲（摂食）増進剤等）と
して使用することができる。

- 本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、生体内において本発
20 明のポリペプチドが減少あるいは欠損している患者がいる場合に、（イ）本発明
のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドを発現させることに
よって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチドを発現さ
せた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のポリペ
プチドを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペ
25 チドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独
あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスア
ソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段
に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そ

のままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

5 本発明のポリペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

10 本発明のポリペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

15 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤など
20 が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

25 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80™、HC

〇-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)
5)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

10 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など)に対して投与することができる。

本発明のポリペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、拒食症の治療目的で本発明のポリペプチドを経口投与
15 する場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき該ポリペプチドを約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該ポリペプチドの1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、拒食症の治療目的で本発明のポリペプチドを注射剤の形で成人(体重60kgとして)に投
20 与する場合、一日につき該ポリペプチドを約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

(2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

25 本発明のポリペプチドはGPR8のリガンドとしての機能などを有するため、本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物またはその塩は、例えば、拒食症、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎

- ，膀胱がん，骨折，乳がん，過食症，多食症，火傷治癒，子宮頸部がん，慢性リンパ性白血病，慢性骨髄性白血病，慢性膵炎，肝硬変，大腸がん（結腸／直腸がん），クローン病，痴呆，糖尿病性合併症，糖尿病性腎症，糖尿病性神経障害，糖尿病性網膜症，胃炎，ヘリコバクター・ピロリ感染症，肝不全，A型肝炎，B
- 5 型肝炎，C型肝炎，肝炎，単純ヘルペスウイルス感染症，水痘帯状疱疹ウイルス感染症，ホジキン病，エイズ感染症，ヒトパピローマウイルス感染症，高カルシウム血症，高コレステロール血症，高グリセリド血症，高脂血症，感染症，インフルエンザ感染症，インシュリン依存性糖尿病（I型），侵襲性ブドウ球菌感染症，悪性黒色腫，がん転移，多発性骨髄腫，アレルギー性鼻炎，腎炎，非ホジ
- 10 キン性リンパ腫，インシュリン非依存性糖尿病（II型），非小細胞肺がん，臓器移植，骨関節炎，骨軟化症，骨減少症，骨粗鬆症，卵巣がん，骨ペーチェット病，消化性潰瘍，末梢血管疾患，前立腺がん，逆流性食道炎，腎不全，リウマチ関節炎，精神分裂症，敗血症，敗血症ショック，重症全身性真菌感染症，小細胞肺がん，脊髄損傷，胃がん，全身性エリテマトーサス，一過性脳虚血発作，結核，
- 15 心弁膜症，血管性／多発梗塞痴呆，創傷治癒，不眠症，関節炎，下垂体ホルモン分泌不全〔例、プロラクチン分泌不全（例、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、更年期障害、甲状腺機能低下等）〕、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等（特に拒食症等）の疾病の治療・予防剤など（特に食欲（摂食）増進剤等）の医薬として使用できる。
- 20 一方、本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物またはその塩は、例えば肥満症〔例、悪性肥満細胞症 (malignant mastocytosis)、外因性肥満 (exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症 (hyperinsulinar obesity)、過血漿性肥満 (hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満 (hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症 (hypoplasmic obesity)、甲状腺機能低下肥満症 (hypothyroid obesity)、視床下部性肥満 (hypothalamic obesity)、症候性肥満症 (symptomatic obesity)、小児肥満 (infantile obesity)、上半身肥満 (upper body obesity)、食事性肥満症 (alimentary obesity)、性機能低下性肥満 (hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症 (systemic mastocytosis)、単純性肥満 (simple obesity)、中心性肥満 (central obesity) など〕、摂食亢進症 (hyperphagia) などの安全で低毒性な予防・治療
- 25

剤、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常などの安全で低毒性な予防・治療剤
5 （プロラクチン産生抑制剤）、好ましくは肥満症、摂食亢進症などの安全で低毒性な予防・治療剤として有用である。

該スクリーニングは、本発明のポリペプチドを用いるか、または組換え型本発明のポリペプチドの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のポリペプチドとその受容体との結合性を変化
10 させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、本発明のポリペプチドの受容体を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP
15 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性などを促進する活性など）を有する化合物（即ち本発明のポリペプチドの受容体アゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（即ち本発明のポリペプチドの受容体アンタゴニスト）などが含まれる。「リガンドとの結合性を変化させる」とは、リガンドとの結合を
20 阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

すなわち、本発明は、

本発明のポリペプチドを用いることを特徴とする本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、具体的には、

（i）本発明の受容体またはその部分ペプチド（以下、これらを単に本発明の受
25 容体と略称する場合がある）に、本発明のポリペプチドを接触させた場合と（ii）上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体の結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドを接触させた場合と (ii) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該本発明の受容体に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

5 本発明のスクリーニング方法は具体的には、

①標識した本発明のポリペプチドを、上記した本発明の受容体に接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

10 ②標識した本発明のポリペプチドを、本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

15 ③標識した本発明のポリペプチドを、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のポリペプチドの受容体に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

20 ④本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチド）を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化

合物および試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドなど）を

本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合における、本発明の受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法などである。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の受容体としては、本発明のポリペプチドをリガンドとして認識するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた本発明の受容体などが適している。

本発明の受容体を製造するには、前述の本発明のポリペプチドの製造方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の受容体を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

本発明の受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

本発明の受容体を含有する細胞としては、本発明の受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。また、本発明の受容体を発現した宿主細胞は、前述の本発明のポリペプチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体の製造方法と同様の方法などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該本発明の受容体を含有する細胞や膜画分中の本発明の受容体の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当な本発明の受容体画分と、標識した本発明

のポリペプチドなどが用いられる。本発明の受容体画分としては、天然型の本発明の受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明の受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ など
5 で標識されたりガンドなどを利用することができる。このうち好ましくは、 $[^{125}\text{I}]$ で標識されたりガンドである。

具体的には、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず本発明の受容体を含む細胞または
10 細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、 $\text{pH } 4 \sim 10$ （望ましくは $\text{pH } 6 \sim 8$ ）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジ
15 ギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明の受容体や本発明のポリペプチドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～1
20 0mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識した本発明のポリペプチドを添加し、同時に $10^{-10} \sim 10^{-7}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のポリペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、
25 ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）をスクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、本発明の受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の受容体を含む細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明の受容体を発現した細胞が必要である。本発明の受容体を発現した細胞としては、前述の本発明の受容体発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の受容体またはその塩、本発明の受容体の部分ペプチドまたはその塩、本発明の受容体を含有する細胞、あるいは本発明の受容体を含有する細胞の膜画分、および本発明のポリペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

- 5 孔径0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②本発明の受容体標品

本発明の受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

10 ③標識リガンド

[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識した本発明のポリペプチドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

④リガンド標準液

- 15 本発明のポリペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

- ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μl の測定用緩衝液を各穴に加える。
20

② $10^{-3} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物溶液を5 μl 加えた後、標識した本発明のペプチドを5 μl 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3}M の本発明のポリペプチドを5 μl 加えておく。

- ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識
25 された本発明のポリペプチドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

5 B₀ : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）であり、具体的には本発明の受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆる本発明の受容体アゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆる本発明の受容体アンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

15 上記本発明の受容体アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の（i）または（ii）に従えばよい。

（i）前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記した本発明の受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

20 （ii）(a) 試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させ、上記本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストである。

25 (b) 本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体アゴニストなど）を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活

性を測定し、比較する。本発明の受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

該本発明の受容体アゴニストは、本発明の受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のポリペプチドと同様に安全で低毒性な医薬（例えば、拒食症の予防・治療薬、食欲（摂食）増進剤、下垂体ホルモン分泌不全〔例、プロラクチン分泌不全（例、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、更年期障害、甲状腺機能低下等）〕の予防・治療薬等）として有用である。

逆に、本発明の受容体アンタゴニストは、本発明の受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、肥満症〔例、悪性肥満細胞症 (malignant mastocytosis)、外因性肥満 (exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症 (hyperinsular obesity)、過血漿性肥満 (hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満 (hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症 (hypoplasmic obesity)、甲状腺機能低下肥満症 (hypothyroid obesity)、視床下部性肥満 (hypothalamic obesity)、症候性肥満症 (symptomatic obesity)、小児肥満 (infantile obesity)、上半身肥満 (upper body obesity)、食事性肥満症 (alimentary obesity)、性機能低下性肥満 (hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症 (systemic mastocytosis)、単純性肥満 (simple obesity)、中心性肥満 (central obesity) など〕、摂食亢進症 (hyperphagia) などの安全で低毒性な予防・治療剤、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンズ、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カステイロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常などの安全で低毒性な予防・治療剤（プロラクチン産生抑制剤）、好ましくは肥満症、摂食亢進症などの安全で低毒性な予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの機能を促進または阻害する化

合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる
5 化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にし
て、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁
液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは
10 温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ
、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、拒食症治療の目的で本発明のポリペプチド
の機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kg当
15 り）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.
0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与す
る場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが
、例えば、拒食症治療の目的で本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物を
注射剤の形で通常成人（60kg当たり）に投与する場合、一日につき該化合物
20 を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好まし
くは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の
動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

また、例えば、肥満症治療の目的で本発明のポリペプチドの機能を阻害する
化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、
25 一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、よ
り好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合
物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、肥満症
治療の目的で本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常
成人（60kg当たり）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～3

0 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

(3) 本発明のポリペプチドの定量

- 5 本発明のポリペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

- 10 (i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法、および
15 (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法を提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のポリペプチドの N 端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドの C 端部に反応する抗体であることが望ましい。

- 20 また、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を用いて本発明のポリペプチドの定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。

- 25 本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性

の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素
5 としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、
10 例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの
15 不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより
20 被検液中の本発明のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。
また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる
25 等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、

本発明のポリペプチドのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる

5 。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免

- 疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、
- 5 同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。
- 10 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドを感度良く定量することができる。
- さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドの濃度を定量することによって、本発明のポリペプチドの濃度の減少が検出された場合、例えば、拒食症、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、
- 15 急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害
- 20 、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病(I型)、侵襲性ブドウ球菌
- 25 感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(II型)、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞

肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全〔例、プロラクチン分泌不全（例、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、更年期障害、甲状腺機能低下等）〕、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等（特に拒食症等）の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明のポリペプチドの濃度の増加が検出された場合には、例えば、肥満症〔例、悪性肥満細胞症 (malignant mastocytosis)、外因性肥満 (exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症 (hyperinsular obesity)、過血漿性肥満 (hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満 (hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症 (hypoplasmic obesity)、甲状腺機能低下肥満症 (hypothyroid obesity)、視床下部性肥満 (hypothalamic obesity)、症候性肥満症 (symptomatic obesity)、小児肥満 (infantile obesity)、上半身肥満 (upper body obesity)、食事性肥満症 (alimentary obesity)、性機能低下性肥満 (hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症 (systemic mastocytosis)、単純性肥満 (simple obesity)、中心性肥満 (central obesity) など〕、摂食亢進症 (hyperphagia)、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常（特に肥満症等）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドの検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

（４）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ

、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合は、例えば、拒食症、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳

虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全〔例、プロラクチン分泌不全（例、卵巣機能低下症、精囊発育不全、更年期障害、甲状腺機能低下等）〕、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等（特に拒食症等）である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合は、例えば、肥満症〔例、悪性肥満細胞症 (malignant mastocytosis)、外因性肥満 (exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症 (hyperinsular obesity)、過血漿性肥満 (hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満 (hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症 (hypoplasmic obesity)、甲状腺機能低下肥満症 (hypothyroid obesity)、視床下部性肥満 (hypothalamic obesity)、症候性肥満症 (symptomatic obesity)、小児肥満 (infantile obesity)、上半身肥満 (upper body obesity)、食事性肥満症 (alimentary obesity)、性機能低下性肥満 (hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症 (systemic mastocytosis)、単純性肥満 (simple obesity)、中心性肥満 (central obesity) など〕、摂食亢進症 (hyperphagia)、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常（特に肥満症等）などである可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

(5) アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、例えば、肥満症〔例、悪性肥満細胞症 (malignant mastocytosis)、外因性肥満 (exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症 (hyperinsular obesity)、過血漿性肥満 (hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満 (hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症 (hypoplasmic obesity)、甲状腺機能低下肥満症 (hypothyroid obesity)、視床下部性肥満 (hypothalamic obesity)、症候性肥満症 (symptomatic obesity)、小児肥満 (infantile obesity)、上半身肥満 (upper body obesity)、食事性肥満症 (alimentary obesity)、性機能低下性肥満 (hypog

onadal obesity)、全身性肥満細胞症(systemic mastocytosis)、単純性肥満(simple obesity)、中心性肥満(central obesity)など]、摂食亢進症(hyperphagia)、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常(特に肥満症等)などの予防・治療薬として使用することができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

(6) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のポリペプチドを中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、肥満症[例、悪性肥満細胞症(malignant mastocytosis)、外因性肥満(exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症(hyperinsulinar obesity)、過血漿性肥満(hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満(hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症(hypoplasmic obesity)、甲状腺機能低下肥満症(hypothyroid obesity)、視床下部性肥満(hypothalamic obesity)、症候性肥満症(symptomatic obesity)、小児肥満(infantile obesity)、上半身肥満(upper body obesity)、食事性肥満症(alimentary obesity)、性機能低下性肥満(hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症(systemic mastocytosis)、単純性肥満(simple obesity)、中心性肥満(central obesity)など]、摂食亢進症(hyperphagia)、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症

候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常（特に肥満症等）などの予防・治療薬などの医薬として使用することができる。

5 本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の肥満症患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

15 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、
20 具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。
25

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁また

は乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50（polyoxyethylene（50 mol） adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg、とりわけ注射剤では 5～100 mg、その他の剤形では 10～250 mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

（7）DNA 転移動物

本発明は、外来性の本発明のポリペプチドをコードする DNA（以下、本発明の外来性 DNA と略記する）またはその変異 DNA（本発明の外来性変異 DNA と略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- （1）本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物、
- （2）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）記載の動物、
- （3）ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第（2）記載の動物、および
- （4）本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物（以下、

本発明のDNA転移動物と略記する)は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス(例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など)またはラット(例えば、Wistar, SDなど)などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異(例えば、突然変異など)が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあた

っては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNA
Aコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトD
NAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動
物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスな
5 ど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDN
Aを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精
卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明
のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯
10 草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオフ
ァージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスま
たはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌
由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが
好ましく用いられる。

15 上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（
例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JC
ウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモータ
ー、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラ
ット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII
20 、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレ
アチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラー
ゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI
型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ β Iサブユニット、ジ
ストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性
25 因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリ
ウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロ
フィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1
組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ド
ーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖

延長因子 1α (EF- 1α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部 (VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシン
5 などのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子 1α (EF- 1α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNA
10 Aの転写を終結する配列 (一般にターミネーターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などを
15 プロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のポリペプチドの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物 (例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来の
20 肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により
25 変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽

細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は
5 その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽
10 細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する
15 。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0066】

20 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドに関連する疾患の病態
25 機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来

性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵

5 細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞

10 の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発

15 明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発

20 明のポリペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害 (dominant negative作用) を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドまたはの機能不

25 活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、

またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、

③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤本発明の変異ポリペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症などを含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
(2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
(3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
5 (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
(5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
(6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
(7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNA
10 Aに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
(9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
(10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発
15 現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進
または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を
20 実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的
25 手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによつて行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のD

NA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ (β -ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエクソンの機能を破壊するか、あるいはエクソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、E S細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのE S細胞を用いてもよいが、通常雄のE S細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

E S細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のE S細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるE S細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるE S細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、E S細胞の遺伝子をロックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-1000$ U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

E S細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり（M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー（Nature）第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.）第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年）、本発明のE S細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変

異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、

- 5 例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のホモ発現不全個体を得ることができる。

- 10 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

- 15 このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを
20 相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

- 25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の生物活性の不活性化

を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(8 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

- 5 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 25 例えば、拒食症、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸が

- ん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス
- 5 感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、
- 10 骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全〔例、プロラクチン分泌不全（例、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、更年期障害、甲状腺機能低下等）〕、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等（特に拒食症等）に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリー
- 15 ニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。
- 20 該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。
- 25 該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。
- 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物

の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、5 蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 10 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 15 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）の拒食症患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg20 として）の拒食症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

（8b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

- 25 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物と

しては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

5 試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

10 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明の
15 ポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペ
20 プチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA / PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検
25 出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物

- の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

- 本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進することができるので、例えば、拒食症、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全〔例、プロラクチン分泌不全（例、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、更年期障害、甲状腺機能低下等）〕、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等（特に拒食症等）の疾病に対する安全で低毒性な治療・予

防剤（特に、食欲（摂食）増進剤）などの医薬として有用である。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を阻害し、該ポリペプチドの機能を阻害することができるので、例えば肥満症〔例、悪性肥満細胞症 (malignant mastocytosis)、外因性肥満 (exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症 (hyperinsulinar obesity)、過血漿性肥満 (hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満 (hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症 (hypoplastic obesity)、甲状腺機能低下肥満症 (hypothyroid obesity)、視床下部性肥満 (hypothalamic obesity)、症候性肥満症 (symptomatic obesity)、小児肥満 (infantile obesity)、上半身肥満 (upper body obesity)、食事性肥満症 (alimentary obesity)、性機能低下性肥満 (hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症 (systemic mastocytosis)、単純性肥満 (simple obesity)、中心性肥満 (central obesity) など〕、摂食亢進症 (hyperphagia)、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常などの予防・治療剤（プロラクチン産生抑制剤）などの予防・治療剤、好ましくは肥満症、摂食亢進症などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の拒食症患者

においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の拒食症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の肥満症患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の肥満症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のポリペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポータ遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のポリペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系とし

て使用できる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
10	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	I	: イノシン
	R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
15	Y	: チミン (T) またはシトシン (C)
	M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
	K	: グアニン (G) またはチミン (T)
	S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
	W	: アデニン (A) またはチミン (T)
20	B	: グアニン (G)、グアニン (G) またはチミン (T)
	D	: アデニン (A)、グアニン (G) またはチミン (T)
	V	: アデニン (A)、グアニン (G) またはシトシン (C)
	N	: アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) もしくはチミン (T) または不明もしくは他の塩基
25	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸

	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
	A T P	: アデノシン三リン酸
	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
5	B H A	: ベンズヒドリルアミン
	p M B H A	: p-メチルベンズヒドリルアミン
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	B z l	: ベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
10	B o c	: t-ブチルオキシカルボニル
	D C M	: ジクロロメタン
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
	T F A	: トリフルオロ酢酸
15	D I E A	: ジイソプロピルエチルアミン
	G l y 又は G	: グリシン
	A l a 又は A	: アラニン
	V a l 又は V	: バリン
	L e u 又は L	: ロイシン
20	I l e 又は I	: イソロイシン
	S e r 又は S	: セリン
	T h r 又は T	: スレオニン
	C y s 又は C	: システイン
	M e t 又は M	: メチオニン
25	G l u 又は E	: グルタミン酸
	A s p 又は D	: アスパラギン酸
	L y s 又は K	: リジン
	A r g 又は R	: アルギニン
	H i s 又は H	: ヒスチジン

	P h e 又は F	: フェニルアラニン
	T y r 又は Y	: チロシン
	T r p 又は W	: トリプトファン
	P r o 又は P	: プロリン
5	A s n 又は N	: アスパラギン
	G l n 又は Q	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	T y r (I)	: 3-ヨードチロシン
	DMF	: N、N-ジメチルホルムアミド
10	Fm o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	T r t	: トリチル
	P b f	: 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホ ニル
	C l t	: 2-クロロトリチル
15	B u ^t	: t-ブチル
	M e t (O)	: メチオニンスルフォキシド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

- 20 ヒト G P R 8 蛋白質をコードする c D N A のスクリーニングに使用した合成 D N A を示す。

〔配列番号：2〕

ヒト G P R 8 蛋白質をコードする c D N A のスクリーニングに使用した合成 D N A を示す。

- 25 〔配列番号：3〕

5'側に制限酵素 C l a I の認識する塩基配列が付加され、また3'側に制限酵素 S p e I の認識する塩基配列が付加されたヒト G P R 8 蛋白質 c D N A の全塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

ヒト G P R 8 蛋白の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

G P R 8 発現 C H O 細胞株の各クローンにおける G P R 8 受容体蛋白質 m R N A の発現量を測定するために使用した riboprobe の配列を示す。

5 〔配列番号：6〕

ブタ視床下部から精製された G P R 8 に対するリガンドペプチドのアミノ末端アミノ酸配列解析の結果から得られたアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

相補鎖が G P R 8 リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードしているとは推定される E S T 配列（アクセッション番号：AW007531）を示す。

〔配列番号：8〕

相補鎖が G P R 8 リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードしているとは推定される E S T 配列（アクセッション番号：AI500303）を示す。

〔配列番号：9〕

15 相補鎖が G P R 8 リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードしているとは推定される E S T 配列（アクセッション番号：AI990964）を示す。

〔配列番号：10〕

相補鎖が G P R 8 リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードしているとは推定される E S T 配列（アクセッション番号：AA744804）を示す。

20 〔配列番号：11〕

G P R 8 リガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードしているとは推定される E S T 配列（アクセッション番号：H31598）を示す。

〔配列番号：12〕

25 G P R 8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードする c D N A のスクリーニングに使用した合成 D N A を示す。

〔配列番号：13〕

G P R 8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードする c D N A のスクリーニングに使用した合成 D N A を示す。

〔配列番号：14〕

ヒト脳由来 cDNA から増幅された GPR8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードする DNA 配列を示す。

〔配列番号：15〕

- 5 GPR8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

配列番号：15 から推定された GPR8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：17〕

- 10 配列番号：15 から推定された GPR8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

配列番号：16 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

- 15 配列番号：17 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

後述の実施例14で合成されたヒトGPRリガンド（1-29）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：21〕

後述の実施例15で合成されたヒトGPRリガンド（1-28）のアミノ酸配列を示す。

- 20 〔配列番号：22〕

後述の実施例16で合成されたヒトGPRリガンド（1-27）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：23〕

後述の実施例17で合成されたヒトGPRリガンド（1-26）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕

- 25 後述の実施例18で合成されたヒトGPRリガンド（1-25）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：25〕

後述の実施例19で合成されたヒトGPRリガンド（1-24）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：26〕

配列番号：20 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

配列番号：21で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

配列番号：22で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

5 〔配列番号：29〕

配列番号：23で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

配列番号：24で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

10 配列番号：25で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

配列番号：4で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

G P R 8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする c

15 DNA の 5' 上流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：34〕

G P R 8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする c

DNA の 5' 上流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：35〕

20 G P R 8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする c

DNA の 5' 上流側 DNA 配列を示す。

〔配列番号：36〕

G P R 8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする c

DNA の 3' 下流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

25 〔配列番号：37〕

G P R 8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする c

DNA の 3' 下流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：38〕

G P R 8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする c

DNAの3'下流側DNA配列を示す。

〔配列番号：39〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

5 〔配列番号：40〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：41〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの配列を示す。

10

〔配列番号：42〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：43〕

15 GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：44〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

20 〔配列番号：45〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側DNA配列を示す。

〔配列番号：46〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

25

〔配列番号：47〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：48〕

GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側 DNA 配列を示す。

〔配列番号：49〕

5 GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：50〕

GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：51〕

10 GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側 DNA 配列を示す。

〔配列番号：52〕

GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA を得るのに使用した合成 DNA を示す。

15 〔配列番号：53〕

GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：54〕

20 GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の配列を示す。

〔配列番号：55〕

GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：56〕

25 配列番号：55 から推定された GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：57〕

配列番号：55 から推定された GPR 8 に対するリガンドペプチドのブタホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：58〕

配列番号：56で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：59〕

配列番号：57で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

5 〔配列番号：60〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：61〕

10 GPR 8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：62〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAの配列を示す。

〔配列番号：63〕

15 GPR 8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：64〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

20 〔配列番号：65〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側DNA配列を示す。

〔配列番号：66〕

25 GPR 8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：67〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：68〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードする
cDNAの3'下流側DNA配列を示す。

〔配列番号：69〕

- 5 GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードする
cDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：70〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードする
cDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：71〕

- 10 GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードする
cDNAの配列を示す。

〔配列番号：72〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白のアミノ酸配
列を示す。

- 15 〔配列番号：73〕

配列番号：72から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのラットホモロ
グのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：74〕

- 20 配列番号：72から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのラットホモロ
グのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：75〕

配列番号：73で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：76〕

配列番号：74で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：77〕

GPR8リガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白の一部をコードしてい
ると推定されるマウスゲノム断片配列を示す。

〔配列番号：78〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白の一部をコー

ドする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：79〕

GPR8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白の一部をコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA を示す。

5 〔配列番号：80〕

マウス精巣由来 cDNA から増幅された GPR8 に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードする DNA 配列を示す。

〔配列番号：81〕

10 GPR8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：82〕

GPR8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：83〕

15 GPR8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側 DNA 配列を示す。

〔配列番号：84〕

GPR8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

20 〔配列番号：85〕

GPR8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：86〕

25 GPR8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側 DNA 配列を示す。

〔配列番号：87〕

GPR8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：88〕

G P R 8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする c D N A を得るのに使用した合成 D N A を示す。

〔配列番号：89〕

5 G P R 8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする c D N A の配列を示す。

〔配列番号：90〕

G P R 8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：91〕

10 配列番号：90から推定された G P R 8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：92〕

配列番号：90から推定された G P R 8 に対するリガンドペプチドのマウスホモログのアミノ酸配列を示す。

15 〔配列番号：93〕

配列番号：91で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：94〕

配列番号：92で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：95〕

20 後述の実施例44で合成されたヒト G P R 8 リガンド (1-23) 酸化体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：96〕

後述の実施例45で合成されたヒト G P R 8 リガンド (1-22) のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：97〕

後述の実施例46で合成されたヒト G P R 8 リガンド (1-21) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：98〕

後述の実施例47で合成されたヒト G P R 8 リガンド (1-20) のアミノ酸配列を示す

。

〔配列番号：99〕

後述の実施例48で合成されたヒトGPR8リガンド(1-19)のアミノ酸配列を示す

。

5 〔配列番号：100〕

後述の実施例49で合成されたヒトGPR8リガンド(1-18)のアミノ酸配列を示す

。

〔配列番号：101〕

後述の実施例50で合成されたヒトGPR8リガンド(1-17)のアミノ酸配列を示す

10 。

〔配列番号：102〕

後述の実施例51で合成されたヒトGPR8リガンド(1-16)のアミノ酸配列を示す

。

〔配列番号：103〕

15 後述の実施例54で合成されたブタGPR8リガンド(1-23)酸化体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：104〕

後述の実施例55で合成されたラットあるいはマウスGPR8リガンド(1-23)酸化体のアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：105〕

後述の実施例12で合成されたFmoc化ヒトGPR8リガンド(1-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：106〕

25 後述の実施例56で合成された[N^α-Acetyl-Trp¹]-ヒトGPR8リガンド(1-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：107〕

後述の実施例57で合成されたヒトGPR8リガンド(2-23)のアミノ酸配列を示す

。

〔配列番号：108〕

後述の実施例58で合成されたヒトGPR8リガンド(4-23)のアミノ酸配列を示す。
。

〔配列番号：109〕

後述の実施例59で合成されたヒトGPR8リガンド(9-23)のアミノ酸配列を示す。
5 。

〔配列番号：110〕

後述の実施例60で合成されたヒトGPR8リガンド(15-23)のアミノ酸配列を示す。
。

〔配列番号：111〕

10 後述の実施例61で合成された[N-Acetyl-Tyr²]-ヒトGPR8リガンド(2-23)のアミノ酸配列を示す。
。

〔配列番号：112〕

後述の実施例62で合成された[D-Trp¹]-ヒトGPR8リガンド(1-23)のアミノ酸配列を示す。
。

15 〔配列番号：113〕

後述の実施例63で合成された[N-3-Indolepropanoyl-Tyr²]-ヒトGPR8リガンド(2-23)のアミノ酸配列を示す。
。

〔配列番号：114〕

配列番号：96で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

20 〔配列番号：115〕

配列番号：97で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。
。

〔配列番号：116〕

配列番号：98で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。
。

〔配列番号：117〕

25 配列番号：99で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。
。

〔配列番号：118〕

配列番号：100で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。
。

〔配列番号：119〕

配列番号：101で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。
。

〔配列番号：120〕

配列番号：102で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：121〕

配列番号：107で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

5 〔配列番号：122〕

配列番号：108で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：123〕

配列番号：109で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：124〕

10 配列番号：110で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：125〕

配列番号：6で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

後述の実施例3で得られた形質転換体、*Escherichia coli* DH5 α /pAKK0-GPR8
15 は、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所（IFO）に2001年2月27日から寄託番号IFO 16564として、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7540として、それぞれ寄託されている。

20 後述の実施例28で得られた形質転換体、*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOP0 Human GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所（IFO）に2001年2月27日から寄託番号IFO 16568として、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号
25 FERM BP-7544として、それぞれ寄託されている。

後述の実施例32で得られた形質転換体、*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOP0 Porcine GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所（IFO）に2001年2月27日から寄託番号IFO 16565として、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7541として、それぞれ寄託されている。

後述の実施例36で得られた形質転換体、Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOP0 Rat GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16567、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7543として、それぞれ寄託されている。

後述の実施例41で得られた形質転換体、Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOP0 Mouse GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16566として、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7542として、それぞれ寄託されている。

15

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

20 実施例1 ヒト脳由来cDNAを用いたPCR法によるヒトGPR8 cDNAの増幅

ヒト脳由来poly (A)⁺RNA(クローンテック)を鋳型として、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写は、タカラRNA PCR ver 2.1キット試薬を使用した。次にこの逆転写生成物を鋳型として用い、配列番号：1および配列番号：2で表される合成プライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。合成プライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが、その際に遺伝子の5'側に制限酵素Cla Iの認識する塩基配列が付加され、3'側に制限酵素Spe Iの認識する塩基配列が付加されるように、5'側および3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、cDNA鋳型5

- μ l, 合成DNAプライマー各 0.4μ M、 0.8 mM dNTPs、pfuポリメラーゼ（ストラタジーン） 0.5μ lおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は 50μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、 $94^{\circ}\text{C} \cdot 60$ 秒の加熱の後、 $94^{\circ}\text{C} \cdot 60$ 秒、 $65^{\circ}\text{C} \cdot 60$ 秒、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 150$ 秒のサイクルを35回繰り返した。
- 5 増幅産物の確認は、 0.8% アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

実施例2 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクロニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による増幅cDNA配列の確認

- 10 実施例1で行なったPCR反応液を 0.8% の低融点アガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの部分をかみそりで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作を行なってDNAを回収した。PCR-Script™ Amp SK (+) クローニングキット（ストラタジーン）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR-Script Amp SK (+)へサブクロ
- 15 ーニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α competent cell（東洋紡）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体*E. coli* DH5 α /GPR8を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、Q
- 20 IAwell 8 Plasmid Kit（キアゲン）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部に対して制限酵素C1aIおよびSpeIによる切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxyTerminator Cycle Sequence Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した（配列番号：3）。図1にヒト
- 25 GPR8受容体蛋白質cDNAの全塩基配列（配列番号：23）およびそれから翻訳されるヒトGPR8受容体蛋白質の全アミノ酸配列（配列番号：4）を示した。

実施例3 GPR8発現CHO細胞の作製

- 実施例2で配列が確認されたヒト脳由来のGPR8の全長アミノ酸配列をコードし5'側にC1aI認識配列を付加し、また3'側にSpeI認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換されたE. coliのクローンからPlasmid Midi Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製し、これを制限酵素
- 5 C1aIおよびSpeIで消化してインサートDNAを切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作により回収された。このインサートDNAをC1aIおよびSpeIで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKK0-111H (S. Hinuma et al., Biochim. Biophys.
- 10 Acta, 1219巻、251-259頁、1994年、記載のpAKK01.11Hと同一のベクタープラスミド) に加え、T4リガーゼ (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミドpAKK0-GPR8を構築した。このプラスミドpAKK0-GPR8で形質転換した大腸菌をDH5 α /pAKK0-GPR8 (Escherichia coli DH5 α /pAKK0-GPR8) と命名した。
- 15 pAKK0-GPR8で形質転換したE. coli DH5 α (東洋紡) を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン) を用いてpAKK0-GPR8プラスミドDNAを調製した。これをCellPect Transfection Kit (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて、添付のプロトコールに従ってCHO dhfr⁻細胞に導入した。4.5 μ gのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に5 x 10⁵または1 x 10⁶個のCHO dhfr⁻細胞を播種した直径6cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM α 培地で培養した。選択培地中に増殖してくるGPR8発現CHO細胞である形質転換細胞のコロニー47クローンを選択した。
- 20
- 25 実施例4 全長ヒトGPR8蛋白質mRNAの発現量の高いCHO/GPR8細胞株の選択

実施例3で樹立されたCHO/GPR8細胞株47クローンの全長GPR8蛋白質mRNAの発現量をCytostar T Plate (アマシャムファルマシアバイオテック) を用い、添付のプロトコールに従って以下のように測定した。CHO/GPR

8細胞株の各クローンをCytostar T Plateに1well当たり 2.5×10^4 個ずつ播種して24時間培養した後、10%ホルマリンによって細胞を固定した。各wellに0.25% Triton X-100を添加して細胞の透過性をあげた後、 ^{35}S ラベルした配列番号：5のriboprobeを加えてハイブリダイズさせた。 $20 \mu\text{g/ml}$ のRNase Aを各wellに加えて遊離のriboprobeを消化し、プレートをよく洗浄した後、ハイブリダイズしたriboprobeの放射活性をTopcounterで測定した。放射活性の高い細胞株は、mRNA発現量が高い。mRNA発現量の高い3クローン（#17, 41および46）を以下に実験に用いたが、特にクローン番号17を用いた。

10 実施例5 GPR8発現CHO細胞を用いた細胞内cAMP産生量の測定

実施例4で作製したCHO/GPR8細胞およびmock CHO細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチルーメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハंकスバッファ（pH7.4）で洗浄した（以下、0.2mM 3-イソブチルーメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハंकスバッファ（pH7.4）を、反応用バッファと呼ぶ）。その後0.5mlの反応用バッファを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファを除き、新たに0.25mlの反応用バッファを細胞に加えた後、試料と $2 \mu\text{M}$ フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファを細胞に加え、 37°C で24分間反応させた。100 μl の20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット（アマシャムファルマシアバイオテック）を用いて測定した。

実施例6 GPR8発現CHO細胞の膜画分を用いたGTP γ S結合活性の測定

GPR8発現CHO細胞膜画分に対する ^{35}S -Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphateの結合促進活性を以下の方法により測定した。最初に膜画分の調整法を記載する。1 $\times 10^8$ 個のCHO/GPR8細胞に10mlのホモジネートバッファ（10mM NaHCO_3 , 5mM EDTA, 0.5mM PMSF, $1 \mu\text{g/ml}$ pepstatin, $4 \mu\text{g/ml}$ E64, $20 \mu\text{g/ml}$ leupeptin）添加し、ポリトロン（12,000 rpm, 1分間）を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心（1,000 g, 15分間）して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離

(Beckman type 30ローター、30,000 rpm, 1時間) し、得られた沈殿物をGPR 8発現CHO細胞膜画分とした。

GTP γ S結合活性の測定は以下の通りである。GPR 8発現CHO細胞膜画分を膜希釈緩衝液 (50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5mM MgCl₂, 150mM NaCl, 1
5 μ M GDP) で希釈して、蛋白質濃度30 mg/mlのアッセイ用細胞膜画分溶液を調製した。アッセイ用膜画分溶液200 μ lに、51.5nM濃度の [³⁵S]-Guanosine 5'-(γ -thio)triphosphate (NEN社) を2 μ lと試料を添加し、この混合液を25℃で一時間保温した。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー (50
10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.1% BSA) 1.5mlで2回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

実施例7 ブタ視床下部抽出物に含まれ、CHO/GPR 8細胞株に対して特異的にcAMP産生抑制およびGTP γ S結合促進を示す活性の検出

15 ブタ視床下部抽出物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) フラクシオンを以下に述べる方法で調製した。東京芝浦臓器 (株) より購入した、処理当日に屠殺して摘出後は氷冷保存したブタ視床下部500 g (30頭分) を細かく切断し、直ぐに沸騰した蒸留水2.0 lに投じて10分間煮沸した。煮沸後、直ちに氷冷し、120
20 mlの酢酸を加えて終濃度1.0 Mとし、ポリトロン (20,000 rpm、6分間) を用いて破碎した。破碎液を遠心 (8,000 rpm、30分) して上清を取り、沈殿には1.0 M酢酸2.0 lを加えて再度ポリトロンによって破碎し、一晩攪拌した後、遠心 (8,000
rpm、30分) して上清を得た。上清に2倍量の冷アセトンを4℃でゆっくり滴下した後、1回目の遠心によって得た上清については一晩攪拌し、2回目の遠心によって得た上清については4時間攪拌した。アセトンを加えた抽出液は遠心 (8,00
25 0 rpm、30分) して沈殿を除き、得られた上清からエバポレーターによって減圧下にアセトンを溜去した。アセトンを除いた抽出液に等量のジエチルエーテルを加え、分液ロートを使って脂質を含むエーテル層を分離して水層を回収した。エーテル脱脂した抽出液はエバポレーターによって減圧下に濃縮してエーテルを完全に除去した。濃縮液をガラス繊維濾紙 (アドバンテック、DP70 (90 mm ϕ)) で濾

過し、濾液をガラス製カラム (30 φ x 240 mm) に充填したC18 (ワイエムシー、Y MCgel ODS-AM 120-S50) カラムに添加した。カラムを1.0 M酢酸400 mlで洗浄後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリル500 mlで溶出した。溶出液を減圧下に濃縮して溶媒を溜去した後、濃縮液を凍結乾燥した。凍結乾燥品約0.5 g
5 を30 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルに溶解し、10 mlずつをC18カラム (トーソー、TSKgel ODS-80TS (21.5 φ x 300 mm)) を用いた10%から60%の0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配溶出法によるHPLCにかけた。HPLCは3回行なった。溶出液は60分画に分取し、3回分の溶出液をまとめた。各分画を減圧下に濃縮・乾固し、残渣を0.5 mlのジメチルス
10 ルフォキシド (DMSO) で溶解した。

上記によって得られたHPLCフラクションのDMSO溶液を実施例5に示した方法によってCHO/GPR8細胞に投与し、細胞内cAMP産生量の測定を行なった結果、分画番号30に顕著なcAMP産生抑制活性が認められた。また同様な試料についてGPR8発現CHO細胞用いてGTPγS結合促進活性を調べ
15 たところ、やはり分画番号30付近に顕著な活性が確認された。これらの活性は他の受容体発現細胞では認められなかったことからブタ視床下部抽出物にGPR8特異的なリガンド活性物質が存在することが示された。

実施例8 ブタ視床下部抽出物中のGPR8発現CHO細胞に対して特異的に細胞内cAMP産生抑制活性を示す活性物質のプロナーゼによる失活
20

実施例7でGPR8発現CHO細胞に対して細胞内cAMP産生抑制活性を示したHPLC分画30を蛋白分解酵素であるプロナーゼ(Sigma, protease Type XIV (P5147)) で処理し、活性物質が蛋白性であるかを調べた。

上記視床下部抽出物HPLC分画 (#30) 2 μlを0.2 M酢酸アンモニウム200
25 μlに加え、これにプロナーゼ3 μgを添加して37℃で2時間インキュベートした後、沸騰水中で10分間加熱してプロナーゼを失活させた。これにBSA 0.05mgおよびCHAPS 0.05 mgを含む蒸留水2 mlを加えてから凍結乾燥した。プロナーゼそのものあるいは加熱および凍結乾燥の影響を調べるため、プロナーゼのみ、HPLC分画のみおよびプロナーゼのみを加熱処理した後にHPLC分画を加えたものにつ

いても同様に処理して凍結乾燥した。凍結乾燥した各試料を実施例5に示す方法によってGPR8発現CHO細胞に添加して細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。ブタ視床下部抽出物中のGPR8発現CHO細胞に対する細胞内cAMP産生抑制活性を示す活性物質はプロナーゼによって完全に失活したことからこの物質が蛋白もしくはペプチドであることが示された。

実施例9 ブタ視床下部からのGPR8発現CHO細胞膜画分に対して特異的にGTPγS結合促進活性を示す活性物質の精製

GPR8に特異的なリガンド活性を示す物質をGPR8発現CHO細胞膜画分に対するGTPγS結合促進活性を指標としてブタ視床下部から精製した代表例を以下に具体的に述べる。実施例7に述べた方法と全く同一の方法により、ブタ視床下部500 g (30頭分) を1.0 M酢酸で抽出し、アセトン沈殿およびエーテル脱脂をした後、C18 (ワイエムシー、YMCgel ODS-AM 120-S50) カラムに吸着させ、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリルで溶出した。溶出液を濃縮し、凍結乾燥した後、C18カラム (トーソー、TSKgel ODS-80TS (21.5 φ x 300 mm)) を用いたHPLCによって活性分画を得た。活性は分画番号30に回収された。これを以下の方法によってさらに精製した。

この分画を10%アセトニトリルを含む10 mMギ酸アンモニウム10 mlに溶解し、陽イオン交換カラム (トーソー、TSKgel SP-5PW (20 mm φ x 150 mm)) に添加した後、10%アセトニトリルを含む10 mMから2.0 Mのギ酸アンモニウムの濃度勾配によってカラムを溶出した。活性はギ酸アンモニウム0.8 M付近に回収された。活性分画を凍結乾燥し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル1.0 mlに溶解し、CNカラム (野村化学、Develosil CN-UG-5 (4.6 mm φ x 250 mm)) に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む21%から26%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。活性はアセトニトリル22.1%付近に出現した。活性分画を凍結乾燥し、0.1 mlのDMSOで溶解し、さらに0.4 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルを加えてODSカラム (和光純薬、Wakosil-II 3C18HG (2.0 mm φ x 150 mm)) に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む22.5%から32.5%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。活性はアセトニトリル26.5%付近

に単一ピークとして出現した（図2）。

実施例10 ブタ視床下部から精製されたGPR8発現CHO細胞膜画分に対して特異的にGTPγS結合促進活性を示す活性物質のアミノ末端アミノ酸配列の
5 解析およびGPR8リガンドのヒトおよびラットホモログペプチドの前駆体蛋白の一部をコードしていると推定されるEST配列

実施例9で精製されたGPR8発現CHO細胞膜画分に対して特異的にGTPγS結合促進活性を示す活性物質のアミノ末端アミノ酸配列解析を行なった。本活性物質は実施例8に示すように蛋白またはペプチドであることが推定されていたので、活性ピークを含む溶出液を用いてパーキンエルマー社Procise 494 Protein Sequencerによってアミノ末端アミノ酸配列分析を行なった。その結果、アミノ末端から17残基までに配列番号：6に示す配列が得られた。この配列はリガ
10 ンドペプチドの一部であると考えられた。

この配列に基づいて遺伝子データベースの検索を行なったところ、そのものもしくはその相補鎖がこのペプチドの前駆体蛋白の一部をコードしていると推定される幾つかのEST（Expressed Sequence Tag）配列が見出された。それらのアクセッション番号、cDNAの由来、配列の長さおよび配列番号は次の通りである。AW007531（anaplastic oligodendroglioma、438 base、配列番号：7）、AI500303（anaplastic oligodendroglioma、264 base、配列番号：8）、AI990964（c
20 olonic mucosa from patient of Crohn's disease、424 base、配列番号：9）、AA744804（germinal center B cell、375 base、配列番号：10）、H31598（PC12 cells、260 base、配列番号：11）。初めの4つはヒト由来であり、最後の1つはラット由来である。これらのESTのDNA配列はブタ視床下部より単離した活性ペプチドの配列に相当するアミノ酸配列をコードする領域では極めてよく一致して
25 てしており、また翻訳されたアミノ酸配列はブタ視床下部より単離され明らかとなったペプチドの配列とは5残基目のThrがValであること以外はほぼ一致した。以上からこれらのESTはGPR8のリガンドペプチドのヒトおよびラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードしているものと推定した。

実施例 1 1 G P R 8 リガンドペプチド前駆体の一部をコードするヒト c D N A
の増幅と増幅 c D N A 配列の解読

実施例 1 0 に述べた G P R 8 リガンドペプチドの前駆体蛋白の一部をコードす
ると推定された E S T 配列に基づいてプライマーを設計し、ヒト脳由来 c D N A
5 より P C R によって G P R 8 リガンドペプチド前駆体の一部をコードする c D N
A を増幅した。

ヒト脳由来 poly (A) +RNA (クローンテック) を鋳型として、ランダムプライマ
ーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写反応には、RNase H 活性を欠失させた M
MLV 由来の逆転写酵素である ReverTra Ace (東洋紡) を使用した。続いて実施例 1
10 0 に述べた E S T 配列に基づいて設計した配列番号 : 1 2 および配列番号 : 1 3
の合成 DNA プライマーを用いて P C R 法による増幅を行なった。反応液の組成
は、c D N A 鋳型 2 μ l、合成 DNA プライマー各 0.5 μ M、1.6 mM dNTPs、LA Taq
(宝酒造) 0.2 μ l および酵素に付属のバッファーで、総反応量は 20 μ l とした。増
幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C \cdot 120
15 秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、72 $^{\circ}$ C \cdot 45 秒のサイクルを 4 回、96 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、70 $^{\circ}$ C \cdot 4
5 秒のサイクルを 4 回、96 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、68 $^{\circ}$ C \cdot 45 秒のサイクルを 4 回、96 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、6
4 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、72 $^{\circ}$ C \cdot 45 秒のサイクルを 5 回、96 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、60 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、72 $^{\circ}$ C \cdot 45 秒
のサイクルを 20 回繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 10 分間保温した。増幅産物の確認は、3
% アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

20 P C R 反応液を 3 % の低融点アガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの
部分をかみそりで切り出した後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用
いて DNA を回収した。TOP0 TA クローニングキット (インビトロゲン) の処方に
従い、回収した DNA をプラスミドベクター pCR2.1-TOP0 へサブクローニングした
。これを Escherichia coli TOP10 (インビトロゲン) に導入して形質転換した後
25 、c D N A 挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよび X-gal を含む L B
寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離
し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含む L B 培地で一晚培
養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミド DNA を調製した
。塩基配列の決定のための反応は Dye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit (PE B

iosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号 : 14 に示す DNA 配列を得た。このこの配列から翻訳される GPR8 リガンドペプチド前駆体蛋白の一部 (配列番号 : 15) には予想どおりブタ視床下部より単離されて配列が明らかになった活性ペプチドに相当するペプチド配列が存在した。さらに、その C 末側には通常の生理活性ペプチドが切り出されると考えられる Arg-Arg の配列 (Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839 巻、9-24 頁、1998 年) が 2ヶ所存在した。このことから、GPR8 のリガンドペプチドのヒトホモログのアミノ酸配列は配列番号 : 16 および 17 のいずれかもしくは両方であると推定された。

10

実施例 12 Fmoc 化ヒト GPR8 ligand (1-23) : Fmoc-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号 : 105) およびヒト GPR8 ligand (1-23) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号 : 16) の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) に Fmoc-Leu を導入した Fmoc-Leu-O-Clt resin (0.76mmol/g) 0.25mmol を出発原料とし、ペプチド合成機 ABI 433A を用い Fmoc/ DCC/ HOBt 法により、Fmoc-Gly, Fmoc-Met, Fmoc-Leu, Fmoc-Leu, Fmoc-Gly, Fmoc-Ala, Fmoc-Ala, Fmoc-Arg (Pbf), Fmoc-Gly, Fmoc-Val, Fmoc-Thr (Bu^t), Fmoc-His (Trt), Fmoc-Tyr (Bu^t), Fmoc-Arg (Pbf), Fmoc-Pro, Fmoc-Ser (Bu^t), Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-His (Trt), Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Tyr (Bu^t), Fmoc-Trp (Boc) の順に縮合を行い、Fmoc-Trp (Boc)-Tyr (Bu^t)-Lys (Boc)-His (Trt)-Val-Ala-Ser (Bu^t)-Pro-Arg (Pbf)-Tyr (Bu^t)-His (Trt)-Thr (Bu^t)-Val-Gly-Arg (Pbf)-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-O-Clt resin 830 mg を得た。この樹脂 150mg に TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 5 ml を加え、室温にて 2 時間振盪した後樹脂をろ去し、溶媒を濃縮後エーテルを加え、粗 Fmoc-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu を沈殿として得た。これを YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分

25

取HPLCで、A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B：72/28～52/48への直線型濃度勾配溶出(60分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末9.7mgを得た。

5 質量分析による(M+H)⁺ 2805.7 (計算値2805.4)

HPLC溶出時間 25.1分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：1

10 00 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分 得られた Fmoc-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu 5 mg に 20% diethylamine / DMF 1 mL を加え室温にて 2 時間攪拌した。溶媒を留去後 YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム(20 x 150mm)を用いた分取HPLCで、A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B：74/26～64/36への直線型濃度勾配溶出(60分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末1.2mgを得た。

15 質量分析による(M+H)⁺ 2583.6 (計算値2583.4)

HPLC溶出時間 20.4分

溶出条件

20 カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：1

00 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

25 実施例13 ヒトGPR8 ligand (1-30) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leu-Trp (配列番号：17) の製造

市販 2-chlorotriethyl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Trp(Boc) を導入したFmoc-Trp(Boc)-O-Clt resin(0.64mmol/g) 0.25mmol を出発原料として実

5 施例 1 2 と同様に配列順通りにアミノ酸を縮合、最後のTrpを導入後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを実施例 1 2 と同様の方法で精製しTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leu-Trpを得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 3543.4 (計算値3544.2)

HPLC 溶出時間 21.5 分

溶出条件

10 カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 1.0ml/分

15 実施例 1 4 ヒトGPR8 ligand (1-29) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leu (配列番号 : 20) の製造

実施例 1 2 の樹脂を用い実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸を縮合したのち樹脂からの切り出しと精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leuを得る。

25 実施例 1 5 ヒトGPR8 ligand (1-28) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr (配列番号 : 21) の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Tyr(Bu^t) を導入したのち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyrを得る。

実施例 1 6 ヒトGPR8 ligand (1-27) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro (配列番号 : 2 2) の製造

- 5 市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Proを導入したのち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Proを得る。

- 10 実施例 1 7 ヒトGPR8 ligand (1-26) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser (配列番号 : 2 3) の製造

- 市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Ser (Bu^t) を導入したのち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精
15 製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Serを得る。

- 実施例 1 8 ヒトGPR8 ligand (1-25) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg (配列番号 : 2 4) の製造

- 市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Arg (Pbf) を導入したのち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精
20 製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Argを得る。

- 25 実施例 1 9 ヒトGPR8 ligand (1-24) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg (配列番号 : 2 5) の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Arg (Pbf) を導入

したのち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Argを得る。

5 実施例 2 0 G P R 8 発現 C H O 細胞膜画分を用いて測定した 23 残基の G P R 8 リガンドペプチドのヒトホモログの G T P γ S 結合促進活性

実施例 1 2 で合成した 23 残基の G P R 8 リガンドペプチドのヒトホモログ（以下、hGPR8L (1-23) と記載することがある）を種々の濃度で実施例 6 に記載した方法で G P R 8 発現 C H O 細胞膜画分に投与して G T P γ S 結合促進活性を測定した。結果を図 3 に示した。明らかに hGPR8L (1-23) は濃度依存的に G P R 8 発現 C H O 細胞膜画分の G T P γ S 結合を促進した。このことから配列番号：1 6 の構造を有するペプチドが G P R 8 に対するリガンドであることが明らかとなった。

15 実施例 2 1 G P R 8 発現 C H O 細胞膜画分を用いて測定した 30 残基の G P R 8 リガンドペプチドのヒトホモログの G T P γ S 結合促進活性

実施例 1 3 で合成した 30 残基の G P R 8 リガンドペプチドのヒトホモログ（以下、hGPR8L (1-30) と記載することがある）を種々の濃度で実施例 6 に記載した方法で G P R 8 発現 C H O 細胞膜画分に投与して G T P γ S 結合促進活性を測定した。結果を図 4 に示した。明らかに hGPR8L (1-30) は濃度依存的に G P R 8 発現 C H O 細胞膜画分の G T P γ S 結合を促進した。このことから配列番号：1 7 の構造を有するペプチドが G P R 8 に対するリガンドであることが明らかとなった。

25 実施例 2 2 G P R 8 発現 C H O 細胞を用いて測定した 23 残基の G P R 8 リガンドペプチドのヒトホモログの細胞内 c A M P 産生抑制活性

実施例 1 2 で合成した hGPR8L (1-23) を種々の濃度で実施例 5 に記載した方法で G P R 8 発現 C H O 細胞に接触させて細胞内 c A M P 産生抑制活性を測定した。結果を図 5 に示した。明らかに hGPR8L (1-23) は濃度依存的に G P R 8 発現 C H O 細胞に対して細胞内 c A M P の産生を抑制した。図中、c A M P 合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファを添加したときの細胞内 c A M P 量が

ら反応用バッファを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を100%として、hGPR8L (1-23) を加えたときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を%として表わした。

5 実施例 2 3 GPR8 発現 CHO 細胞を用いて測定した30残基のGPR8 リガンドペプチドのヒトホモログの細胞内 cAMP 産生抑制活性

実施例 1 3 で合成したhGPR8L (1-30) を種々の濃度で実施例 5 に記載した方法で GPR8 発現 CHO 細胞に接触させて細胞内 cAMP 産生抑制活性を測定した。結果を図 7 に示した。明らかにhGPR8L (1-30) は濃度依存的にGPR8 発現 CHO
10 細胞に対して細胞内 cAMP の産生を抑制した。図 7 中、cAMP 合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファを添加したときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を100%として、hGPR8L (1-30) を加えたときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を%として表わした。

15

実施例 2 4 GPR8 ligandの摂食行動に対する作用

Wistar雄性ラット (9週令) の側脳室 (AP:8.1, L:1.8, H:7.1mm) にペントバルビタール麻酔下でガイドカニューレ (AG-8) を挿入した。その後、1週間以上回復させてから実験を行った。回復期間中、毎日ハンドリングを行い、脳室内投与
20 時のストレスを軽減させた。

摂食実験は15:00から開始した。ラットに無麻酔、無拘束下でマイクロインジェクションカニューレを取り付け、PBSに溶解させた実施例 1 2 で得たペプチド (配列番号: 1 6 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド) またはPBSのみを5 μ l/minで2分間投与した。投与終了後から1分後にマイクロインジェクションカニューレを取り外し、あらかじめ重量を計測しておいた餌 (固形飼料 CE2: 日本クレア)
25 ア) を自由に摂食させた。投与開始から時間を計測し、30、60、120分後に餌を計量して摂食量を求めた (図 6)。

実施例 2 5 ヒトGPR8 リガンド前駆体蛋白をコードする cDNA の5'上流端

のクローニング

実施例 11 に記載した G P R 8 のリガンドペプチドのヒトホモログ（以下、ヒト G P R 8 リガンドと記載することがある）の前駆体蛋白の一部をコードするヒト c D N A 配列（配列番号：14）を基に作製したプライマーでヒト視床下部 c D N A を鋳型とした 5' RACE PCR を行ない、ヒト G P R 8 リガンド前駆体蛋白をコードする c D N A の 5' 上流塩基配列を明らかにした。5' RACE PCR クローニングは、ヒト視床下部 Marathon-Ready c D N A （CLONTECH）を鋳型としてキットに添付の A P 1 プライマーと配列番号：33 の合成プライマーで P C R 反応を行ない、次にこの P C R 反応液を鋳型としてキットに添付の A P 2 プライマーと配列番号：34 の合成プライマーで P C R 反応を行なうことにより達成された。P C R の反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はヒト視床下部 c D N A 4 μ l 、 A P 1 プライマー 0.5 μ M 、配列番号：33 の合成 D N A プライマー 0.5 μ M 、 0.4 m M d N T P s 、 L A T a q ポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ l および酵素に付属の G C （I）バッファで総反応量を 20 μ l とし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・240秒のサイクルを 30 回繰り返し、さらに 72℃で 10 分間保温した。次に、キットに添付の Tricine-EDTA Buffer で 50 倍希釈した P C R 反応液 2 μ l 、 A P 2 プライマー 0.5 μ M 、配列番号：34 の合成 D N A プライマー 0.5 μ M 、 0.4 m M d N T P s 、 L A T a q ポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ l および酵素に付属の G C （I）バッファで総反応量を 20 μ l とし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、72℃・180秒のサイクルを 4 回、次に 96℃・30秒、70℃・180秒のサイクルを 4 回、次に 96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを 17 回、最後に 72℃で 10 分間保温した。増幅した D N A を 1.2% のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約 1,200 塩基長の D N A をカミソリで切り出し、D N A を Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t （キアゲン）を用いて回収した。この D N A を、T O P O T A C l o n i n g K i t （Invitrogen）のプロトコールに従って p C R 2.1-T O P O ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) T O P 10 c o m p e t e n t c e l l （Invitrogen）に導入して形質転換した後、c D N A 挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよび X-gal を含む L B 寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝

を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB
培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドD
NAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequ
encing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケ
ンサーを用いて解読し、配列番号：35に示すDNA配列を得た。

実施例26 ヒト脳cDNAの作製

ヒト脳cDNAは、Marathon™ cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用
いてヒト脳poly A(+) RNA (CLONTECH) から作製した。RACE PCRに供されるcDN
Aは1st strand cDNA合成を除き、キットに添付のプロトコールに従って作製
した。1st strand cDNAは、キットに添付の逆転写酵素AMVの代わりに逆転写酵
素MMLV (-RNase H) (RevTraAce, 東洋紡) を用いて、1μgのヒト脳poly A(+) RNA
から合成した。

15 実施例27 ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流端 のクローニング

実施例11に記載のヒトGPR8リガンド前駆体蛋白の一部をコードするヒト
cDNA配列(配列番号：14)を基に作製したプライマーでヒト脳cDNAを
鋳型とした3' RACE PCRを行ない、ヒトGPR8リガンドをコードするcDNAの
3'下流塩基配列を明らかにした。3' RACE PCR クローニングは、ヒト脳 cDNAを
鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号：36の合成プライマー
でPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP
2プライマーと配列番号：37の合成プライマーでPCR反応を行なうことによ
り達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は
キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したヒト脳cDNA 1μl、A
P1プライマー0.5μM、配列番号：36の合成DNAプライマー0.5μM、0.4 mM
dNTPs、LATAqポリメラーゼ(宝酒造) 0.2μlおよび酵素に付属のGC(I)バッフ
ァーで総反応量を20μlとし、サーマルサイクラー(PE Biosystems) を用い、96
℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・240秒のサイクルを30回繰り返し、さ

らに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したPCR反応液1μl、AP2プライマー0.5μM、配列番号：37の合成DNAプライマー0.5μM、0.4mM dNTPs、LATaqポリメラーゼ（宝酒造）0.2μlおよび酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20μlとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、72℃・180秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、70℃・180秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを17回、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）を用いて回収した。このDNAを、TOPOTA Cloning Kit（Invitrogen）のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOTAベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ（*Escherichia coli*）TOP10 competent cell（Invitrogen）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit（キアゲン）を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（PE Biosystems）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：38に示すDNA配列を得た。

20

実施例28 ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAのクローニング

ヒト視床下部cDNAを鋳型として、ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流塩基配列を基に作製したプライマーとヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流塩基配列を基に作製したプライマーでPCR増幅を行なうことにより、ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、ヒト視床下部Marathon-Ready cDNA（CLONTECH）1μl、配列番号：39の合成DNAプライマー0.5μM、配列番号：40の合成DNAプ

25

ライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、2.5 mM $MgCl_2$ 、5% DMSO、LATaqポリメラーゼ(宝酒造) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、64℃・30秒、72℃・120秒のサイクルを35回、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約700塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：41に示すDNA配列を得た。

この配列 (配列番号：41) はヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするためこのDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOPOヒトGPR8リガンド前駆体 (*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Human GPR8 Ligand Precursor) と命名した。

配列番号：41に示すDNA配列には、実施例11に記載したヒトGPR8リガンドペプチドのアミノ酸配列をコードするようなフレームが存在するが、その5'上流側には蛋白翻訳の開始コドンであると予想されるATGが存在しない。しかし、これまでに幾つかの蛋白でATG以外のコドンを開始コドンとすることが予想されている例が報告されている (ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (H. Prats et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86巻、1836-1840頁、1989年、R. Z. Flor kiewiczおよびA. Sommer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86巻、3978-3981頁、1989年)、マウスレチノイン酸受容体 β 4 (S. Nagpal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89巻、2718頁、1992年)、ヒトホスホリボシルピロリン酸合成酵素

(M. Taira et al., J. Biol. Chem., 265巻、16491-16497頁、1990年)、ショウ
ジョウバエコリンアセチル転移酵素 (H. Sugihara et al., J. Biol. Chem., 26
5巻、21714-21719頁、1990年))。

これらの例ではA T Gに代わりL e uをコードするC T Gが開始コドンとして
5 仮定されていることが多い。ヒトG P R 8リガンド前駆体蛋白においても同様で
あると考え、後述のブタあるいはラットのG P R 8リガンドホモログの前駆体蛋
白との比較からこれらの前駆体蛋白における開始コドンと予想されるA T Gにほ
ぼ対応する位置に存在するC T Gコドンを開始コドンと仮定し、前駆体蛋白の配
列を推定した。この仮想的ヒトG P R 8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列を配
10 列番号：4 2に示した。また、仮想的ヒトG P R 8リガンド前駆体蛋白のアミノ
酸配列およびDNA配列を図8に示した。

実施例29 ブタ脊髄cDNAの作製

ブタ脊髄cDNAは、Marathon™ cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を
15 用いてブタ脊髄poly A(+) RNAから作製した。ブタ脊髄poly A(+) RNAは、ブタ脊
髄から以下のように調製した。ブタ脊髄を、ISOGEN (日本ジーン) 中にてポリト
ロンホモゲナイザーで完全に破碎し、この破碎溶液からI S O G E N溶液を用い
たtotal RNA調製法に従ってブタ脊髄total RNAを得た。次に、ブタ脊髄total RN
AからmRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) に添付のoligo dT
20 celluloseカラムを用いたクロマトグラフィーを2回行なうことにより、7μgの
ブタ脊髄poly A(+) RNAを得た。RACE PCRに供したcDNAは1st strand cDNA
合成を除き、キットに添付のプロトコールに従って作製した。1st strand cDNA
は、キットに添付の逆転写酵素AMVの代わりに逆転写酵素MMLV (-RNase H) (RevT
raAce, 東洋紡) を用いて、1μgのブタ脊髄poly A(+) RNAから合成した。

25

実施例30 ブタG P R 8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流端 のクローニング

1回目の5'RACE PCR クローニングと、そのP C R増幅DNAの塩基配列を利用
した2回目の5'RACE PCR クローニングにより、G P R 8のリガンドペプチドのブ

タホモログ（以下、ブタGPR8リガンドと記載することがある）の前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。

- 1 回目の5'RACE PCR クローニングは、上記ブタ脊髄cDNAを鋳型としてキットに添付のAP 1プライマーと配列番号：43の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP 2プライマーと配列番号：44の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。
- PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はキットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したブタ脊髄cDNA 4 μ l、AP 1プライマー0.5 μ M、配列番号：43の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LATAq
- 10 ポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ lおよび酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで100倍希釈したPCR反応液1 μ l、AP 2プライマー0.5 μ M、配列番号：44の合成DNAプライ
- 15 マー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ（CLONTECH）0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、72℃・180秒のサイクルを3回、次に96℃・30秒、70℃・180秒のサイクルを3回、次に96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、64℃・30秒、72℃・180秒のサイ
- 20 クルを15回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約300塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）を用いて回収した。このDNAを、TOPOTA Cloning Kit（Invitrogen）のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOTAベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia*
- 25 *coli*) TOP10F' competent cell（Invitrogen）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit（キアゲン）を用いてプラスミドDNAを調

整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：45に示すDNA配列を得た。

2回目の5'RACE PCR クローニングは、ブタ脊髄cDNAを鋳型としてキットに
5 添付のAP1プライマーと配列番号：46の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：47の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したブタ脊髄cDNA 1 μ l、AP1プライマー0
10 .5 μ M、配列番号：46の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを20回繰り返
15 し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで100倍希釈したPCR反応液1 μ l、AP2プライマー0.5 μ M、配列番号：47の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、6
20 8 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを31回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約200塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いて回収した。このDNAを、TOPOTA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOP0ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア
25 コリ (*Escherichia coli*) TOP10F' competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラ

スミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：48に示すDNA配列を得た。

5 実施例31 ブタGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流端のクローニング

ブタGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流端の塩基配列を基に作製したプライマーを用いた3'RACE PCRクローニングにより、ブタGPR8リガンドペプチドの前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流塩基配列を明らかにした。3'RACE PCR クローニングは、ブタ脊髄cDNAを鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号：49の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：50の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したブタ脊髄cDNA 1 μ l、AP1プライマー0.5 μ M、配列番号：49の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを20回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで100倍希釈したPCR反応液1 μ l、AP2プライマー0.5 μ M、配列番号：50の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを31回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約650塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロト

コールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア
コリ (*Escherichia coli*) TOP10F' competent cell (Invitrogen) に導入して形質
転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-gal
、IPTGを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した
つま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを
5 含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラ
スミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cy
cle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自
動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：51に示すDNA配列を得た。

10

実施例32 ブタGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAのクローニ ング

ブタ脊髄cDNAを鋳型として、ブタGPR8リガンド前駆体蛋白をコードす
るcDNAの5'上流塩基配列を基に作製したプライマーとブタGPR8リガンド
15 前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流塩基配列を基に作製したプライマーで
PCR増幅を行なうことにより、ブタGPR8リガンド前駆体蛋白をコードする
cDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりで
ある。反応液は、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したブタ脊髄
cDNA 1 μ l、配列番号：52の合成DNAプライマー0.5 μ M、配列番号：53
20 の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage 2ポリメラーゼ (CLON
TECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサ
イ클ー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・
75秒のサイクルを4回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・75秒のサイクルを4回、次に96
 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・75秒のサイクルを4回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・4
25 5秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、60 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを2
0回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロー
スゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、
DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDN
Aを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPO

ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 54に示すDNA配列を得た。この配列 (配列番号: 54) はブタGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするためこのDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOP0ブタGPR8リガンド前駆体 (*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOP0 Porcine GPR8 Ligand Precursor) と命名した。

配列番号: 54のDNA配列がコードするブタGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列を配列番号: 55に示した。この前駆体蛋白のアミノ酸配列には実施例10に記載のGPR8発現細胞膜画分に対するGTP γ S結合活性を指標にブタ視床下部より単離されたGPR8リガンドペプチドのアミノ酸配列分析によって明らかにされたアミノ末端から17残基までの配列が存在した。さらにその配列のカルボキシ末端側にはGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ前駆体蛋白の場合と同様に、通常の生理活性ペプチドが切り出されると考えられるArg-Argの配列 (Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年) が2ヶ所存在した。このことから、GPR8リガンドペプチドのブタホモログのアミノ酸配列は配列番号: 56および57のいずれかもしくは両方であると推定された。ブタGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列およびDNA配列を図9に示した。

25

実施例33 ラットGPR8リガンド前駆体蛋白の一部をコードするcDNA断片のクローニング

実施例10に記載したように、GPR8発現細胞膜画分に対するGTP γ S結合活性を指標にブタ視床下部から精製したペプチドのアミノ末端から17アミノ

酸配列（配列番号：6）に基づいてデータベース検索を行なったところ、配列番号：11の塩基配列に合致するラットEST塩基配列（アクセッション番号：H31598）が見出された。このDNA配列は15アミノ酸の配列がブタ視床下部から精製したペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6）と同一となる翻訳枠を持っていた。このH31598は、ラットPC12細胞から作製したcDNAライブラリー由来のEST配列であり、未確定な7塩基を含む260塩基からなる。このH31598はGPR8リガンドのラットホモログペプチド（以下、ラットGPR8リガンドと記載することがある）の前駆体蛋白の一部をコードしていると推定されたのでその正確な塩基配列を決定するため、H31598の5'塩基配列と3'塩基配列を基に作製したそれぞれのプライマーでラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) を鋳型としたPCRクローニングを行なった。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。ラット脳Marathon cDNA (CLONTECH) 2 μ l、配列番号：60の合成DNAプライマー0.5 μ M、配列番号：61の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファ

5
10
15
20
25

ーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、60 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・60秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを4.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約250塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。

個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：62に示すDNA配列を得た。PCRクローニングしたDNAの塩基配列（配列番

号：62)とH31598の塩基配列との比較により、1塩基欠失の読み誤りがH31598の塩基配列にあることが明らかになった。

5 実施例34 ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流端のクローニング

5'RACE PCR クローニングによりラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。5'RACE PCR クローニングは、ラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH)を鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号：63の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：64の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はラット脳Marathon cDNA 2 μ l、AP1プライマー0.5 μ M、配列番号：63の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ(宝酒造)0.2 μ lおよび酵素に付属のGC(I)バッファ

15 ーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー(PE Biosystems)を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・120秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで200倍希釈したPCR反応液2 μ l、AP2プライマー0.5 μ M、配列番号：64の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ(CLONTECH)

20 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー(PE Biosystems)を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・120秒のサイクルを31回、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン)を用いて回収した。

25 このDNAを、TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell(Invitrogen)に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転

換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、

5 配列番号：65に示すDNA配列を得た。

実施例35 ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流端のクローニング

ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流端の塩基配列を基に作製したプライマーおよびラットGPR8リガンド前駆体蛋白の一部をコードするcDNA断片配列を基に作製したプライマーを用いた3'RACE PCRクローニングにより、ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流塩基配列を明らかにした。3'RACE PCR クローニングは、ラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) を鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号

10 : 66の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：67の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、ラット脳Marathon-Ready cDNA 2 μ l、AP1プライマー0.5 μ M、配列番号：66の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総

15 反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで200倍希釈したPCR反応液2 μ l、AP2プライマー0.5 μ M、配列番号：67の合成DNA

20 プライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソ

リで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOP0 TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOP0ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、

5 cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。

10 塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：68に示すDNA配列を得た。

実施例36 ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAのクローニング

15 ラット脳cDNAを鋳型として、ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流塩基配列を基にしたプライマーとラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流塩基配列を基にしたプライマーでPCR増幅を行なうことにより、ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。

20 反応液は、ラット脳Marathon-Ready cDNA 1 μ l、配列番号：69の合成DNAプライマー0.5 μ M、配列番号：70の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、60 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・60秒のサイクルを35回

25 繰り返す、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約750塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOP0 TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOP0ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 c

competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、c DNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：71に示すDNA配列を得た。この配列（配列番号：71）は、ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするためこのDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOP0ラットGPR8リガンド前駆体 (Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOP0 Rat GPR8 Ligand Precursor) と命名した。

配列番号：71のDNA配列がコードするラットGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列を配列番号：72に示した。この前駆体蛋白のアミノ酸配列には実施例10に記載のGPR8発現細胞膜画分に対するGTPγS結合活性を指標にブタ視床下部より単離されたGPR8リガンドペプチドのアミノ酸配列分析によって明らかにされたアミノ末端から17残基までの配列と5残基目および17残基目のアミノ酸のみが異なる類似した配列が存在した。さらにその配列のカルボキシ末端側にはGPR8リガンドペプチドのヒトあるいはブタホモログ前駆体蛋白の場合と同様に、通常の生理活性ペプチドが切り出されると考えられるArg-Argの配列 (Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年) が2ヶ所存在した。これらのことから、GPR8リガンドペプチドのラットホモログのアミノ酸配列は配列番号：73および74のいずれかもしくは両方であると推定された。ラットGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列およびDNA配列を図10に示した。

25

実施例37 マウスGPR8リガンド前駆体蛋白の一部をコードするcDNA断片のクローニング

配列番号：58の23アミノ酸残基のブタGPR8リガンドペプチドをコードする塩基配列に基づいてデータベース検索を行なった。セラ社マウスゲノムデ

データベースに対して検索を行なった結果、配列番号：58の塩基配列に類似した塩基配列を含む配列番号：77のマウスゲノム断片配列が見出された。この配列はGPR8リガンドペプチドのマウスホモログ（以下、マウスGPR8リガンドと記載することがある）の前駆体蛋白の一部をコードするゲノム断片配列である
5 ことが予想された。

マウス精巣cDNAを鋳型として、このマウスゲノム断片配列を基に作製したプライマーでPCR増幅を行ない、増幅DNAの塩基配列を決定した。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。マウス精巣cDNA (CLONTECH) 1 μ l、配列番号：78の合成DNAプライマー0.5 μ M、配列番号：79の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LATaqポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ lおよび酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・120秒のサイクルを10回繰り返し、次に96℃・30秒、64℃・30秒、72℃・120秒のサイクルを25回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約350塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOP
10 0ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) T OP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit（キアゲン）を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (P
15 E Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した（配列番号：80）。ここに得られたPCRクローニングしたcDNAの塩基配列（配列番号：80）は、配列番号：78および配列番号：79のプライマーに用いた2つの塩基配列に挟まれたマウスゲノム断片塩基配列に完全に一致した。

実施例 3 8 マウス脳 cDNA の作製

マウス脳 cDNA は、SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用いてマウス脳 poly A (+) RNA (CLONTECH) から、キットに添付のプロトコールに従って作製した。合成した 1st strand cDNA 溶液を、キットに添付の Tricine-
5 EDTA Buffer で 10 倍に希釈し、この溶液を RACE PCR 反応に供した。

実施例 3 9 マウス GPR 8 リガンド前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流端のクローニング

5'RACE PCR クローニングにより、マウス GPR 8 リガンド前駆体蛋白をコード
10 する cDNA の 5' 上流塩基配列を明らかにした。5'RACE PCR クローニングは、マウス脳 cDNA を鋳型として SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit に添付の Universal Primer Mix と配列番号 : 8 1 の合成プライマーで PCR 反応を行ない、次にこの PCR 反応液を鋳型としてキットに添付の Nested Universal Primer と配列番号 : 8 2 の合成プライマーで PCR 反応を行なうことにより達成された。P
15 CR の反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はマウス脳 cDNA 1 μ l、Universal Primer Mix 2 μ l、配列番号 : 8 1 の合成 DNA プライマー 0.2 μ M、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC 2 ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ l および酵素に付属のバッファーで総反応量を 20 μ l とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96°C・120 秒の加熱の後、96°C・30 秒、68°C・120 秒のサイクルを 3
20 0 回繰り返す、さらに 72°C で 10 分間保温した。次に、キットに添付の Tricine-EDTA Buffer で 50 倍希釈した PCR 反応液 0.5 μ l、Nested Universal Primer 0.5 μ M、配列番号 : 8 2 の合成 DNA プライマー 0.5 μ M、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC 2 ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ l および酵素に付属のバッファーで総反応量を 20 μ l とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96°C・120 秒の加熱
25 の後、96°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・120 秒のサイクルを 30 回繰り返す、さらに 72°C で 10 分間保温した。増幅した DNA を 1.5% のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約 300 塩基長の DNA をカミソリで切り出し、DNA を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。この DNA を、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従って pCR2.1-TOPO ベクターへクローニ

ングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：83に示すDNA配列を得た。

10

実施例40 マウスGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流端のクローニング

3'RACE PCRクローニングにより、マウスGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流塩基配列を明らかにした。3'RACE PCR クローニングは、マウス脳cDNAを鋳型としてSMARTTM RACE cDNA Amplification Kitに添付のUniversal Primer Mixと配列番号：84の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のNested Universal Primerと配列番号：85の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、マウス脳cDNA 1 μ l、Universal Primer Mix 2 μ l、配列番号：84の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したPCR反応液0.5 μ l、Nested Universal Primer 0.5 μ M、配列番号：85の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを30回繰り返し、最

後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約700塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPOTA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOTAベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：86に示すDNA配列を得た。

15 実施例41 マウスGPR8リガンド前駆体蛋白質をコードするcDNAのクローニング

マウス脳cDNAを鋳型として、マウスGPR8リガンド前駆体蛋白質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を基にしたプライマーとマウスGPR8リガンド前駆体蛋白質をコードするcDNAの3'下流塩基配列を基にしたプライマーでPCR増幅を行なうことにより、マウスGPR8リガンド前駆体蛋白質をコードするcDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、マウス脳cDNA 0.5 μ l、配列番号：87の合成DNAプライマー0.5 μ M、配列番号：88の合成DNAプライマー0.5 μ M、1.6 mM dNTPs、LATaqポリメラーゼ (宝酒造) 0.2 μ lおよび酵素に付属のGC (I) バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、64℃・30秒、72℃・120秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約700塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPOT

A Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従って pCR2.1-TOPO ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよび X-gal を含む LB 寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含む LB 培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミド DNA を調整した。塩基配列の決定のための反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：89 に示す DNA 配列を得た。この配列 (配列番号：89) は、マウス GPR8 リガンド前駆体蛋白をコードするため、この DNA を含むプラスミドで形質転換した大腸菌を TOP10/pCR2.1-TOPO マウス GPR8 リガンド前駆体 (*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Mouse GPR8 Ligand Precursor) と命名した。

配列番号：89 に示す DNA 配列には、実施例 10 に記載の GPR8 発現細胞膜画分に対する GTPγS 結合活性を指標にブタ視床下部より単離された GPR8 リガンドペプチドのアミノ酸配列分析によって明らかにされたアミノ末端から 17 残基までの配列と 5 残基目および 17 残基目のアミノ酸のみが異なる類似したアミノ酸配列をコードするようなフレームが存在する。しかし、ヒト GPR8 リガンド前駆体の場合と同様に、その 5' 上流側には蛋白翻訳の開始コドンであると予想される ATG が存在しない。しかし、ヒト GPR8 リガンド前駆体蛋白において推測されたように、ブタあるいはラットの GPR8 リガンドホモログの前駆体蛋白との比較からこれらの前駆体蛋白における開始コドンと予想される ATG にほぼ対応する位置に存在する CTG コドンを開始コドンと仮定し、マウス GPR8 リガンド前駆体蛋白の配列を推定した。この仮想的マウス GPR8 リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列を配列番号：90 に示した。マウス GPR8 リガンドのアミノ酸配列と予想される配列のカルボキシ末端側には GPR8 リガンドペプチドのヒト、ブタあるいはラットホモログ前駆体蛋白の場合と同様に、通常の生理活性ペプチドが切り出されると考えられる Arg-Arg の配列 (Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839 巻、9-24 頁、1998 年) が 2 ヶ所存在した。これ

らのことから、GPR8リガンドペプチドのマウスホモログのアミノ酸配列は配列番号：91および92のいずれかもしくは両方であると推定された。なお、配列番号：91の23残基型マウスGPR8リガンドのアミノ酸配列は、23残基型ラットGPR8リガンドのアミノ酸配列（配列番号：73）と一致している。

- 5 仮想的マウスGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列およびDNA配列を図11に示した。

実施例42 ラクトパーオキシダーゼ法を用いた $[^{125}\text{I-Tyr}^2]$ -hGPR8L(1-23) および $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23) の作製

- 10 DMSO 5 μl に溶かしたhGPR8L(1-23)（配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド）1 nmolを0.1 M 塩化ニッケル5 μl と混合し、0.1 M HEPES (pH 7) に溶かした0.001% 過酸化水素水 10 μl 、0.1 M HEPES (pH 7) に溶かしたラクトパーオキシダーゼ（シグマ社）10 $\mu\text{g/ml}$ を10 μl および $[^{125}\text{I}]$ NaI 37 MBq（NENライフサイエンスプロダクツ社）10 μl を混合後、室温で60分反応し、
15 以下の条件でHPLC分取した。

用いたカラムは、ODS-80TM (4.6 mm x 15 cm)（トーソー社）、溶出液Aとして10% アセトニトリル/0.1% TFA、溶出液Bとして60% アセトニトリル/0.1% TFAを用い、0-0 (2 min)、0-30 (3 min)、30-38 (5 min)、38-43 (55 min) %B/A+Bのグラディエント溶出法を行なった。流速は1 mL/min、カラム温度は25℃、

- 20 検出は220nmの吸光度を用いて行った。

hGPR8L(1-23) には、チロシン残基が2つ存在するので、ヨード化によって、 $[^{125}\text{I-Tyr}^2]$ -hGPR8L(1-23) および $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23) が生成する。このHPLC条件では、hGPR8L(1-23) が24分、 $[^{125}\text{I-Tyr}^2]$ -hGPR8L(1-23) が30分、 $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23) が32分付近に溶出した。

25

実施例43 $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23) を用いた受容体結合実験

実施例42に記載したように作製した $[^{125}\text{I}]$ -標識hGPR8L(1-23) および実施例6に記載した方法と同様にしてヒトGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜面分を用いて受容体結合実験を行なった。

ヒトGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を、アッセイ用バッファ
ー (25 mM Tris-HCl、5 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸)、0.05% CHAPS (3
- [(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] -1-プロパン硫酸)、0.
1% BSA (ウシ血清アルブミン)、0.25 mM PMSF (フェニルメタンスルホニルフル
5 オライド)、1 μ g/ml ペプスタチン、20 μ g/ml ロイペプチン、pH 7.4) で各種濃
度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に200 μ lずつ分注した。最
大結合量 (TB) を測定するために2 μ lのDMSOと7 nMの [125 I-Tyr 2]-hGPR8L (1-23) ま
たは [125 I-Tyr 10]-hGPR8L (1-23) 2 μ lを膜画分溶液に添加した。また、非特異的結
合 (NSB) を測定するために100 μ M hGPR8L (1-23) のDMSO溶液2 μ lと7 nMの [125 I-T
10 yr 2]-hGPR8L (1-23) または [125 I-Tyr 10]-hGPR8L (1-23) 2 μ lを膜画分溶液に添加し
た。25 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラス
フィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過した。ろ過後、 γ -カウンターを用
いてろ紙上に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて
特異的結合量 (SB) を見積もった。 [125 I-Tyr 2]-hGPR8L (1-23) を用いた場合に比べ
15 て [125 I-Tyr 10]-hGPR8L (1-23) を用いた方が、特異的結合量が2倍多かったので実際の
の結合実験には [125 I-Tyr 10]-hGPR8L (1-23) を用いた。膜画分の濃度を変化させると
膜画分の濃度に依存した [125 I-Tyr 10]-hGPR8L (1-23) の特異的な結合が認められた。
また、膜画分濃度を5 μ g/ml に設定して阻害率 (%) からhGPR8L (1-23) の50
%阻害濃度 (IC $_{50}$ 値) を算出したところ、IC $_{50}$ 値は0.25 nMであった。図12に種
20 々の濃度におけるhGPR8L (1-23) の結合阻害を示す。

実施例44 ヒトGPR8 ligand (1-23) 酸化体: Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met (O)-Gly-Leu (配列番
号: 95) の製造

25 実施例12の化合物0.45 mg を 50% 酢酸水0.5 mlに溶解後、0.3%過酸化水素
水0.05 mlを 加え、室温にて8時間放置した。減圧濃縮後SepPakにより精製し、白
色粉末0.443 mgを得た。

質量分析による (M+H) $^{+}$: 2599.2 (計算値2599.4)

HPLC溶出時間: 19.1 分

溶出条件

カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 10
0/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

5 流速 : 1.0 ml/分

実施例 4 5 ヒトGPR8 ligand (1-22) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-
Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly (配列番号 : 9 6) の製
造

10 市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33 mmol/g) にFmoc-Gly を導入し
たのち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製
を行ない目的物を得た。

実施例 4 6 ヒトGPR8 ligand (1-21) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-
15 Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met (配列番号 : 9 7) の製造
市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Met を導入したの
ち実施例 - 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を
行ない目的物を得た。

20 】実施例 4 7 ヒトGPR8 ligand (1-20) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Ar
g-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu (配列番号 : 9 8) の製造
市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Leuを導入したの
ち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行
ない目的物を得た。

25 質量分析によるM⁺ : 2282.8 (計算値2282.6)

HPLC溶出時間 : 17.2 分

溶出条件

カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 10

0/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 : 1.0 ml/分

- 実施例 4 8 ヒトGPR8 ligand (1-19) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-
5 Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu (配列番号 : 9 9) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin、1.33mmol/g) にFmoc-Leuを導入したの
ち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行
ない目的物を得た。

質量分析による M^+ : 2169.6 (計算値2169.5)

- 10 HPLC溶出時間 : 16.4 分

溶出条件

カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液 : 0.1%TFA-水、B液 : 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B : 10

0/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

- 15 流速 : 1.0 ml/分

- 実施例 4 9 ヒトGPR8 ligand (1-18) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-
Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly (配列番号 : 1 0 0) の製造

- 20 市販2-chlorotrityl resin (Clt resin、1.33mmol/g) にFmoc-Glyを導入したの
ち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行
ない目的物を得た。

質量分析による M^+ : 2056.8 (計算値2056.3)

HPLC溶出時間 : 14.2 分

溶出条件

- 25 カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液 : 0.1%TFA-水、B液 : 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B : 10

0/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 : 1.0 ml/分

実施例 5 0 ヒトGPR8 ligand (1-17) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala (配列番号 : 1 0 1) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin、1.33mmol/g)にFmoc-Alaを導入したの
ち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行
5 ない目的物を得た。

実施例 5 1 ヒトGPR8 ligand (1-16) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala (配列番号 : 1 0 2) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin、1.33mmol/g)にFmoc-Alaを導入したの
10 ち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行
ない目的物を得た。

実施例 5 2 ブタGPR8 ligand (1-23) : Trp-Tyr-Lys-His-Thr-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号 : 5 6)
15 の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin、1.33mmol/g)にFmoc-Leuを導入したの
ち実施例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行
ない目的物を得た。

質量分析による $(M+H)^+$: 2585.2 (計算値2585.4)

20 HPLC溶出時間 : 20.2 分

溶出条件

カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 10
0/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

25 流速 : 1.0 ml/分

実施例 5 3 ラット/マウスGPR8 ligand (1-23) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ser-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leuの製造
(配列番号 : 7 3 および配列番号 : 9 1)

実施例 5 2 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得ることができる。

5 実施例 5 4 ブタ GPR8 ligand (1-23) 酸化体 : Trp-Tyr-Lys-His-Thr-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met (0) -Gly-Leu (配列番号 : 1 0 3) の製造

実施例 5 2 の化合物を用い実施例 4 4 と同様に酸化して目的物を得た。

質量分析による $(M+H)^+$: 2601.3 (計算値 2601.4)

HPLC 溶出時間 : 18.9 分

10 溶出条件

カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液 : 0.1% TFA-水、B液 : 0.1% TFA 含有 アセトニトリルを用い、A/B : 10/0 ~ 0/70 へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 : 1.0 ml/分

15

実施例 5 5 ラット / マウス GPR8 ligand (1-23) 酸化体 : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ser-Gly-Leu-Leu-Met (0) -Gly-Leu (配列番号 : 1 0 4) の製造

20 実施例 5 3 の化合物を用い実施例 4 4 と同様に酸化して目的物を得ることができる。

実施例 5 6 $[N^{\alpha}$ -Acetyl-Trp]-ヒト GPR8 ligand (1-23) : Ac-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号 : 1 0 6) の製造

25 実施例 1 2 で調製した樹脂の Fmoc 基を除去、無水酢酸でアセチル化した後、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを実施例 1 2 と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 2626.12625.8 (計算値 2627.12626.1)

HPLC溶出時間 21.4 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 1

5 00 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

実施例57 ヒトGPR8 ligand (2-23) : Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr
-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 107)

10 の製造

実施例12と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のTyrを導入後
樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、 TFA / thioanisole / m
-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で
処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを実
15 施例12と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 2397.1 (計算値2397.3)

HPLC溶出時間 19.9 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

20 溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 1
00 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

実施例58 ヒトGPR8 ligand (4-23) : His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr
25 -Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 108) の製造

実施例12と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のHisを導入後
樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、 TFA / thioanisole / m
-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で
処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを実

施例 1 2 と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 2106.0 (計算値2106.1)

HPLC 溶出時間 20.0 分

溶出条件

- 5 カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 1.0ml/分

- 10 実施例 5 9 ヒトGPR8 ligand (9-23) : Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号 : 1 0 9) の製造

実施例 1 2 と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のArgを導入後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、 TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) で

- 15 処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを実施例 1 2 と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1615.0 (計算値1614.9)

HPLC 溶出時間 20.2 分

溶出条件

- 20 カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 1.0ml/分

- 25 実施例 6 0 ヒトGPR8 ligand (15-23) : Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号 : 1 1 0) の製造

実施例 1 2 と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のArgを導入後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、 TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) で

処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを実施例 1 2 と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 901. 4 (計算値901. 5)

HPLC 溶出時間 20. 2 分

5 溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4. 6 x 100mm)

溶離液 A液: 0. 1%TFA-水、B液: 0. 1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 1. 0ml/分

10

実施例 6 1 [N-Acetyl-Tyr²]-ヒトGPR8 ligand (2-23): Ac-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 1 1 1) の製造

15 実施例 5 7 で調製した樹脂を無水酢酸でアセチル化した後、実施例 5 7 と同様に処理、精製し目的物を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 2439. 3 (計算値2439. 3)

HPLC 溶出時間 20. 2 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4. 6 x 100mm)

20 溶離液 A液: 0. 1%TFA-水、B液: 0. 1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 1. 0ml/分

25 実施例 6 2 [D-Trp¹]-ヒトGPR8 ligand (1-23): D-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 1 1 2) の製造

実施例 1 2 のFmoc-Trp (Boc) の代わりにFmoc-D-Trp (Boc) を用い同様に目的物を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 2583. 4 (計算値2583. 4)

HPLC溶出時間 20.6 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 1

5 00 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

実施例63 [N-3-Indolepropanoyl-Tyr²]-ヒトGPR8 ligand (2-23): 3-Indolep
ropanoyl-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala
10 -Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 1 1 3) の製造

実施例12のFmoc-Trp(Boc)の代わりに3-Indolepropionic acidを用い所望の樹脂を得、これをTFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethane
dithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基
の除去を同時に行った。粗ペプチドを実施例12と同様の方法で精製し目的物を
15 得た。

質量分析による(M+H)⁺ 2568.4 (計算値2568.4)

HPLC溶出時間 21.7 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

20 溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 1
00 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

実施例64 GPR8発現CHO細胞膜画分を用いて測定したGPR8リガンド
25 ペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のGTPγS結合促進活性

本明細書に合成法を記載したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモ
ログの誘導体を種々の濃度で実施例6に記載した方法でGPR8発現CHO細胞
膜画分に投与してGTPγS結合促進活性を測定した。測定した誘導体の配列番
号とGTPγS結合促進活性を表1に示した。なお、活性は50%有効濃度 (EC₅₀)

値) で示した。また、実施例 20 および 21 に記載の hGPR8L (1-23) および hGPR8L (1-30) の GTP γ S 結合促進活性も合わせて記載した。

5 実施例 65 GPR8 発現 CHO 細胞膜画分および [¹²⁵I-Tyr¹⁰]-hGPR8L (1-23) を用いて測定した GPR8 リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体の受容体結合活性

本明細書に合成法を記載した GPR8 リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体の受容体結合活性を実施例 43 に記載した方法で GPR8 発現 CHO 細胞膜画分および [¹²⁵I-Tyr¹⁰]-hGPR8L (1-23) を用いて測定した。測定した誘導体の
10 配列番号と受容体結合活性を表 1 に示した。なお、受容体結合活性は 50% 結合阻害濃度 (IC₅₀ 値) で示した。また、実施例 43 に記載の hGPR8L (1-23) の受容体結合活性も合わせて記載した。

【表 1】

15

表 1

GPR8 リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体の GTP γ S 結合促進活性および受容体結合活性

誘導体	配列番号	GTP γ S 結合促進活性 (EC ₅₀ nM)	受容体結合活性 (IC ₅₀ nM)
hGPR8L (1-23)	16	1.6	0.25
hGPR8L (1-30)	17	0.57	0.025
[Met (0)]-hGPR8L (1-23)	95	1.4	0.31
Fmoc-hGPR8L (1-23)	105	240	0.20
Ac-hGPR8L (1-23)	106	14	2.4
[D-Trp ¹]-hGPR8L (1-23)	112	7.1	0.82

hGPR8L (2-23)	107	3900	160
Ac-hGPR8L (2-23)	111	7200	420
IndPr-hGPR8L (2-23)	113	5. 0	0. 28
hGPR8L (4-23)	108	6700	1400
hGPR8L (9-23)	109	4200	1300
hGPR8L (1-20)	98	0. 86	0. 20
hGPR8L (1-19)	99	1000	100
hGPR8L (1-18)	100	>10000	2700
pGPR8L (1-23)	56	1. 5	0. 38
[Met (0)]-pGPR8L (1-23)	103	0. 73	0. 29

実施例 6 6 G P R 8 リガンドペプチドのプロラクチン放出促進作用

Wistar雄性ラット（9週令）の第三脳室（AP:-7. 1、L:0. 0、H:2. 0mm）にペントバルビタール麻酔下でガイドカニューレ（AG-12）を挿入した。その後、1週間以上回復させてから実験を行った。回復期間中、毎日ハンドリングを行い、脳室内投与時のストレスを軽減させた。

実験の前日に、ペントバルビタール麻酔下にて右頸静脈に採血用のカニューレを挿入した。実験は9:00-12:00に行った。ラットに無麻酔、無拘束下でマイクロインジェクションカニューレを取り付け、PBSに溶解させた実施例 1 2 で得たヒト G P R 8 リガンドペプチド（配列番号: 1 6）（n=9）またはPBSのみ（n=10）を5 μ l/minで2分間投与した。投与終了後から1分後にマイクロインジェクションカニューレを取り外し、自由に行動させた。ペプチド投与前および投与開始から5、10、20、30、60分後に300 μ lづつ採血を行った。体内の水分量を一定に保つために、血液を採取した後に同量の生理食塩水を頸静脈より投与した。血液にヘパリンを加えた後に遠心（5000rpm \times 10min, 4 $^{\circ}$ C）して血漿を分離した。血漿中プロラクチンレベルはラットプロラクチン [125 I] アッセイシステム（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社）を用いたラジオイムノアッセイにより測定し

た。

結果を図13に示す。これより明らかに、GPR8リガンドペプチドはラット脳室内投与によって血中プロラクチン量を増加させることがわかる。

5 産業上の利用可能性

- 本発明のDNAまたは本発明のポリペプチドは、①本発明のポリペプチドの有する生理作用の探索、②合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、③GPR8のリガンドや前駆体蛋白質をコードするDNAの入手、④組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤抗体および抗血清の入手、⑥DNA、抗体を用いた診断薬の開発、⑦中枢神経機能調節剤などの医薬の開発、⑧遺伝子治療等に用いることができる。

請求の範囲

1. 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩と結合する能力を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
2. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
3. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列を有する請求項2記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
4. 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：6、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：56、配列番号：57、配列番号：73、配列番号：74、配列番号：91、配列番号：92、配列番号：95、配列番号：96、配列番号：97、配列番号：98、配列番号：99、配列番号：100、配列番号：101、配列番号：102、配列番号：103、配列番号：104、配列番号：105、配列番号：106、配列番号：107、配列番号：108、配列番号：109、配列番号：110、配列番号：111、配列番号：112または配列番号：113で表されるアミノ酸配列である請求項2記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
5. 配列番号：15、配列番号：42、配列番号：55、配列番号：72または配列番号：90で表されるアミノ酸配列を含有する請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
6. 請求項1記載のポリペプチドをコードするDNAを含有するDNA。
7. 配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：

- 号：1 2 1、配列番号：1 2 2、配列番号：1 2 3、配列番号：1 2 4または配列番号：1 2 5で表される塩基配列を有する請求項6記載のDNA。
8. 配列番号：1 4、配列番号：4 1、配列番号：5 4、配列番号：7 1または配列番号：8 9で表される塩基配列を有する請求項6記載のDNA。
- 5 9. 請求項6記載のDNAを含有する組換えベクター。
10. 請求項9記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
11. 請求項10記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のポリペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
- 10 12. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
13. 請求項6記載のDNAまたは請求項12記載の抗体を含有してなる診断薬。
14. 請求項6記載のDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、
- 15 該DNAの発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA。
15. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる組成物。
16. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
- 20 17. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる食欲増進剤。
18. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなるプロラクチン産生促進剤。
19. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 25 20. 標識した請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる請求項19記載のスクリーニング方法。

21. さらに、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその塩、または該蛋白質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項19記載のスクリーニング方法。
- 5 22. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 10 23. さらに、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその塩、または該蛋白質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求項22記載のスクリーニング用キット。
- 15 24. 請求項19記載のスクリーニング方法または請求項22記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。
- 20 25. 請求項19記載のスクリーニング方法または請求項22記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
26. 請求項19記載のスクリーニング方法または請求項22記載のスクリーニング用キットを用いて得られる抗肥満剤。
27. 請求項19記載のスクリーニング方法または請求項22記載のスクリーニング用キットを用いて得られる食欲増進剤。
- 25 28. 請求項19記載のスクリーニング方法または請求項22記載のスクリーニング用キットを用いて得られるプロラクチン産生抑制剤。
29. 哺乳動物に対し、請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の有効量を投与することを特徴とする食欲増進方法。
- 。

30. 哺乳動物に対し、請求項19記載のスクリーニング方法または請求項22記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする肥満の予防治療方法。

5 31. 食欲増進剤を製造するための、請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の使用。

32. 抗肥満剤を製造するための、請求項19記載のスクリーニング方法または請求項22記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の使用。

10

33. 請求項6記載のDNAを用いることを特徴とするトランスジェニック動物。

34. 請求項9記載の組換えベクターにより動物に導入されることを特徴とする請求項33記載のトランスジェニック動物。

15 35. 動物が非ヒト哺乳動物である請求項33記載のトランスジェニック動物。

36. 請求項6記載のDNAが不活性化されたノックアウト動物。

37. 請求項6記載のDNAが他の遺伝子の導入により不活性化された請求項36記載のノックアウト動物。

38. 他の遺伝子がレポーター遺伝子である請求項37記載のノックアウト動物。

20

39. 動物が非ヒト哺乳動物である請求項36記載のノックアウト動物。

40. 請求項33または請求項36記載の動物を用いることを特徴とする請求項6記載のDNAの欠損・損傷に起因する疾病に対して効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

図 1

1 atgcaggccgctgggcacccagagcccccttgacagcaggggctcccttcctccctccccacg
M Q A A G H P E P L D S R G S F S L P T
61 atgggtgccaaacgtctctcaggacaatggcactggccacaatgccaccttctccgagcca
M G A N V S Q D N G T G H N A T F S E P
121 ctgccgttccctctatgtgctccctgccccgctgtactccgggatctgtgctgtggggctg
L P F L Y V L L P A V Y S G I C A V G L
181 actggcaacacggccgtcatccttgtaatcctaagggcgcccaagatgaagacggtgacc
T G N T A V I L V I L R A P K M K T V T
241 aacgtgttcatccctgaacctggccgtcgccgacgggctcttcacgtggctactgcccgtc
N V F I L N L A V A D G L F T L V L P V
301 aacatcgcgagacacctgtgtcagtactggcccttcggggagctgtctgtcaagctgggtg
N I A E H L L Q Y W P F G E L L C K L V
361 ctggccgtcgaccactacaacatcttctccagcatctacttccctagccgtgatgagcgtg
L A V D H Y N I F S S I Y F L A V M S V
421 gaccgataacctgggtggtgtgctggccaccgtgaggtcccgccacatgccctggcgcacctac
D R Y L V V L A T V R S R H M P W R T Y
481 cggggggcggaaggtcgccagccigtgtgtctgtgctggcggtcacggctcctgggttctgccc
R G A K V A S L C V W L G V T V L V L P
541 ttcttctcttctcgctggcgctctacagcaacgagctgcaggtcccaagctgtgggcctgagc
F F S F A G V Y S N E L Q V P S C G L S
601 ttcccgtggcccgagcgggtctgggttcaaggccagccgtgtctacactttggctcctgggc
F P W P E R V W F K A S R V Y T L V L G
661 ttctgtgtgcccgtgtgcaccatctgtgtgtctctacacagacctcctgcgccaggctgcgg
F V L P V C T I C V L Y T D L L R R L R
721 gccgtgcggctccgctctggagccaaggctctaggcaaggccaggcggaaggtgaccgtc
A V R L R S G A K A L G K A R R K V T V
781 ctggctcctcgctgtgtgctggccgtgtgctcctctgtctggacgccccctccacctggcctct
L V L V V L A V C L L C W T P F H L A S
841 gtcgtggccctgaccacggacctgccccagacccactgggtcatcagtatgtcctacgtc
V V A L T T D L P Q T P L V I S M S Y V
901 atcaccagcctcacgtacgccaactcgtgcctgaaccccttccctctacgcccttcttagat
I T S L T Y A N S C L N P F L Y A F L D
961 gacaacttccggaagaacttccgcagcataattgcgggtgctga
D N F R K N F R S I L R C

図 2

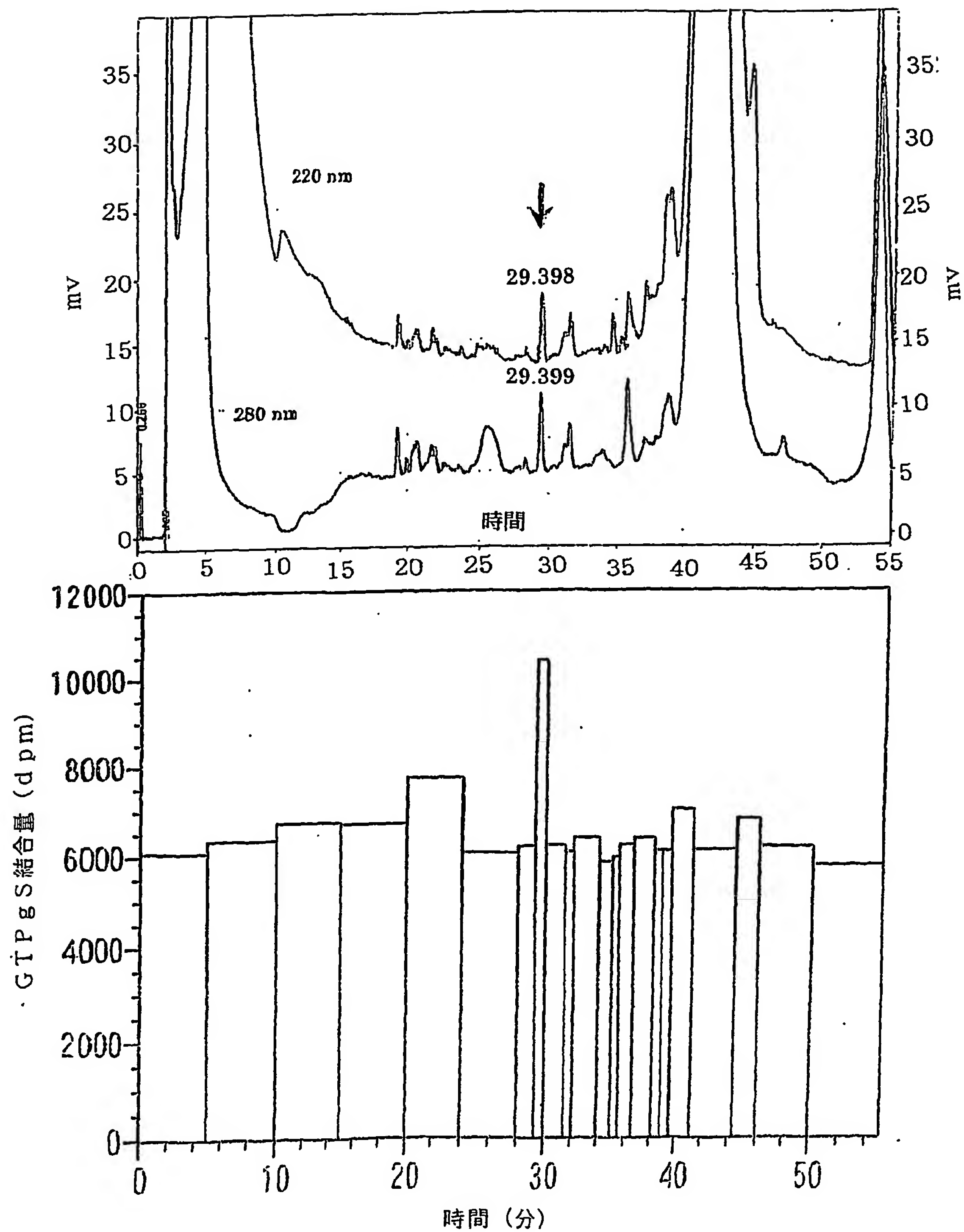


図 3

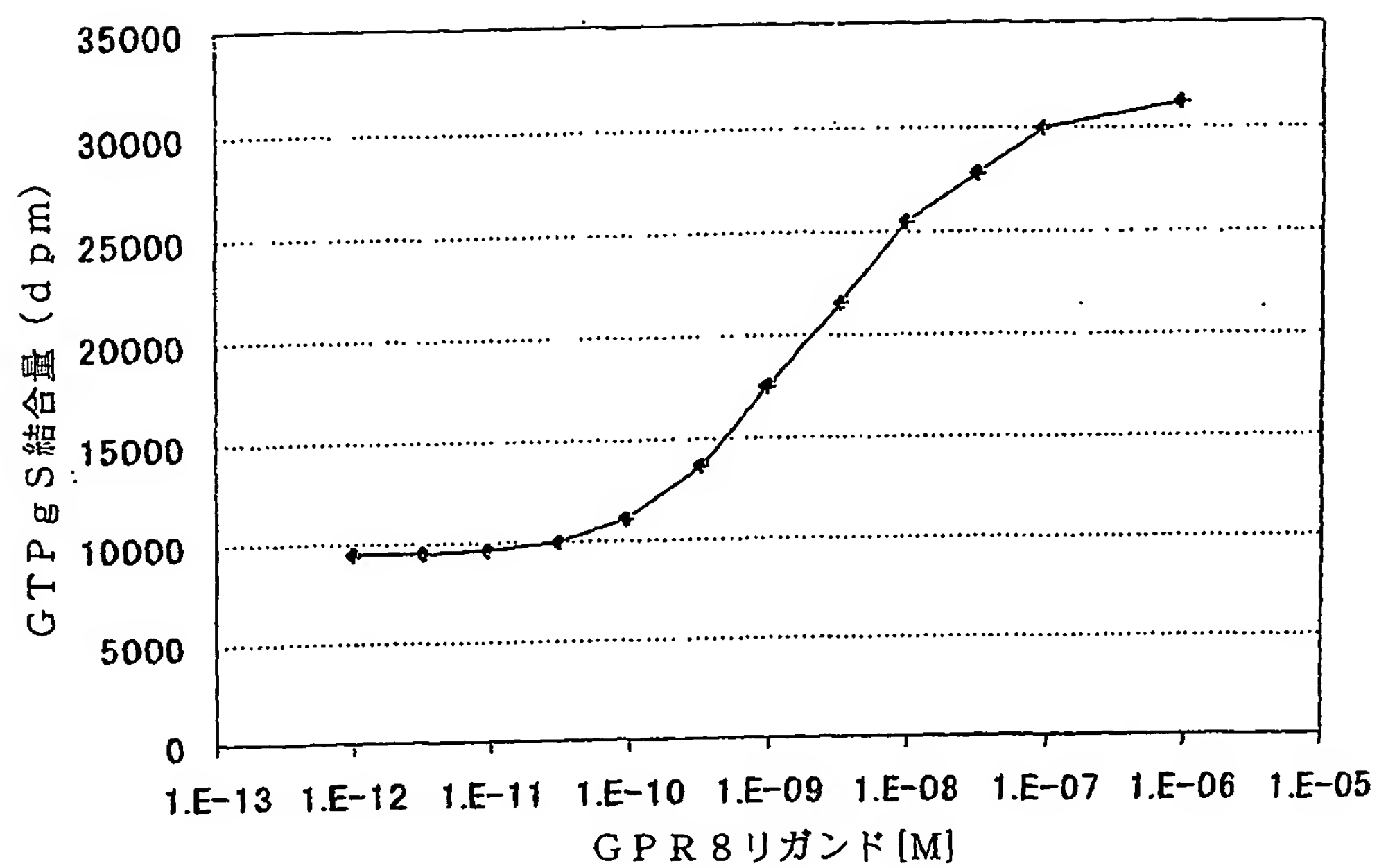


図 4

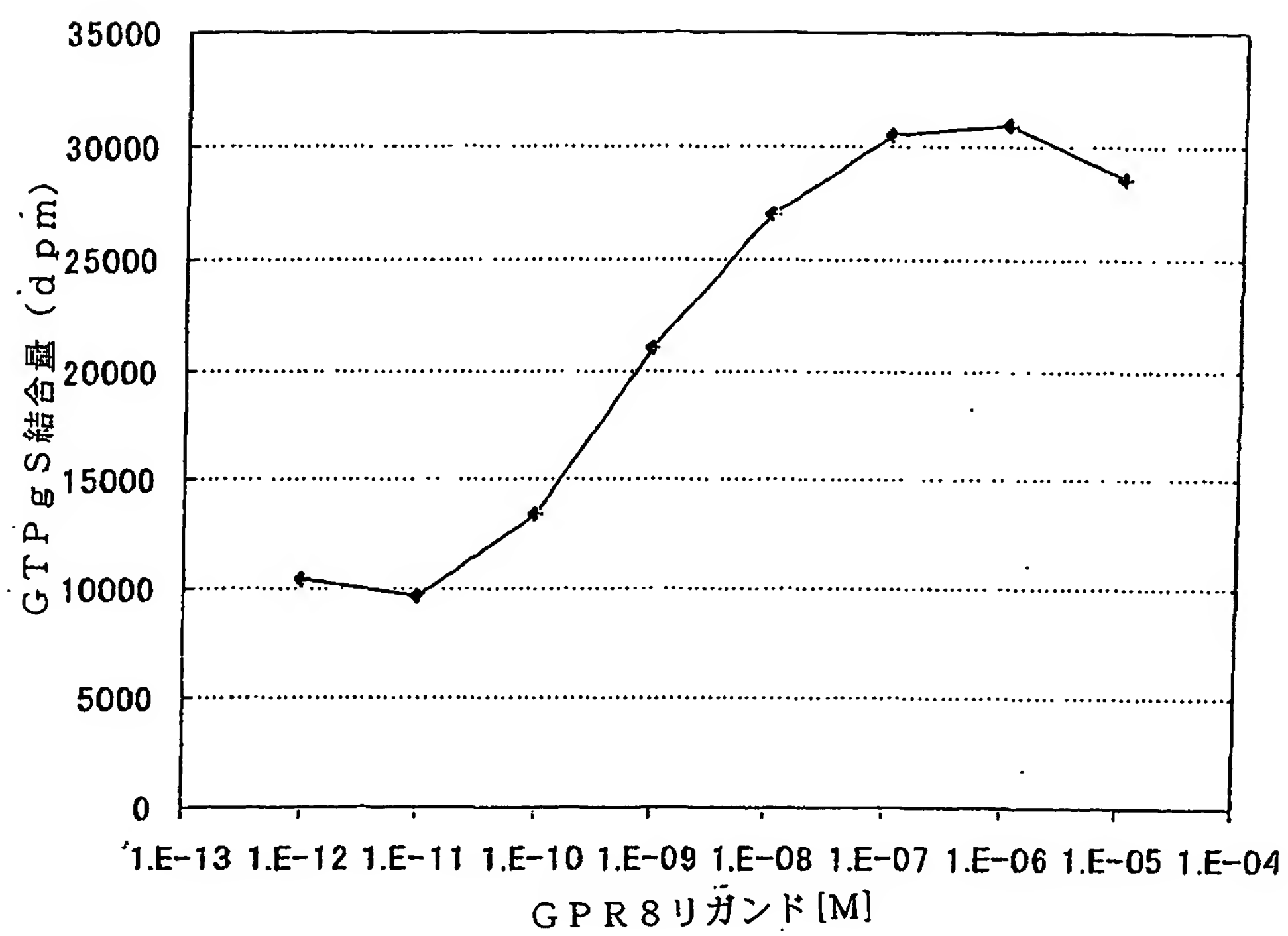


図 5

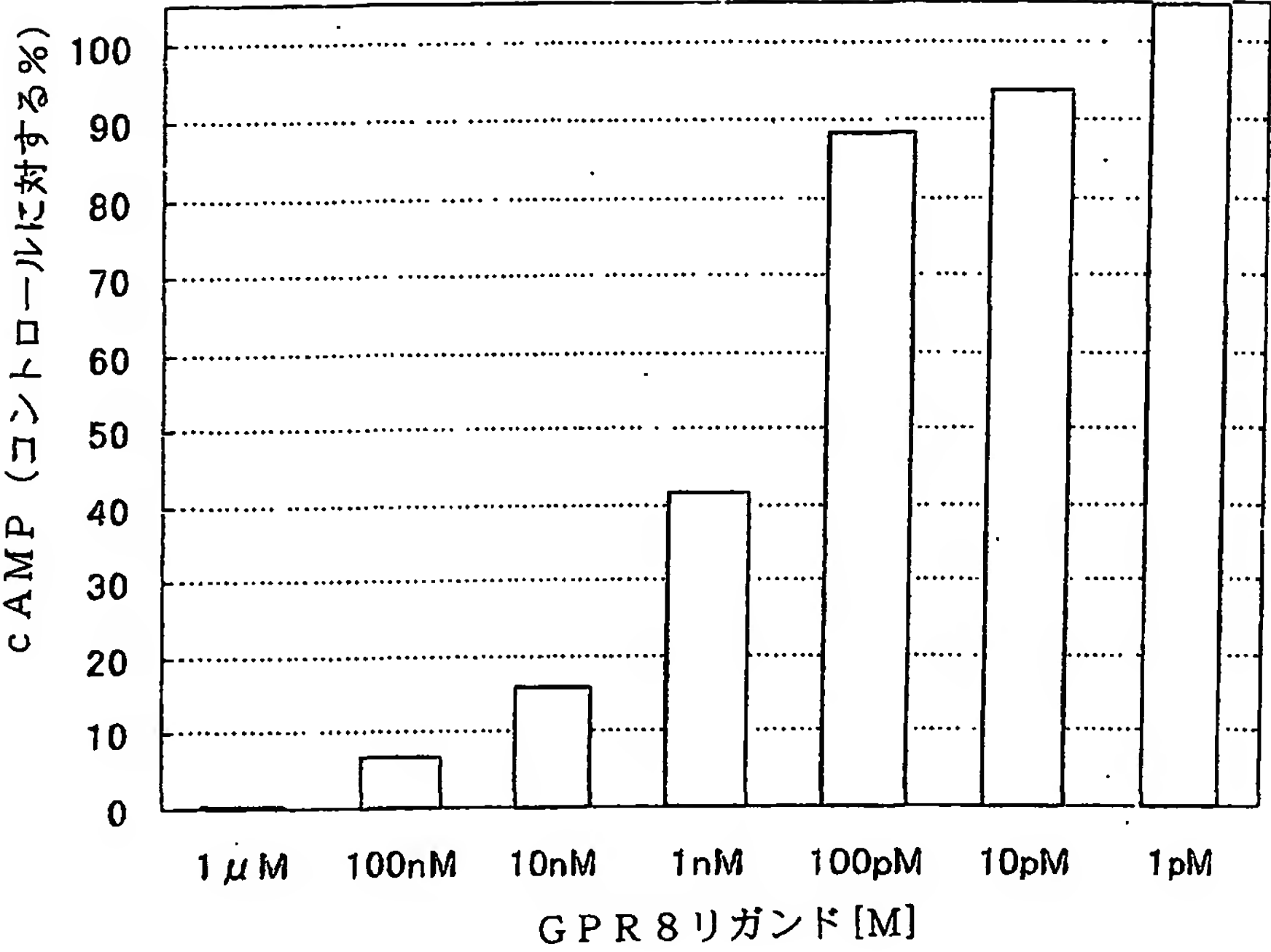


図 6

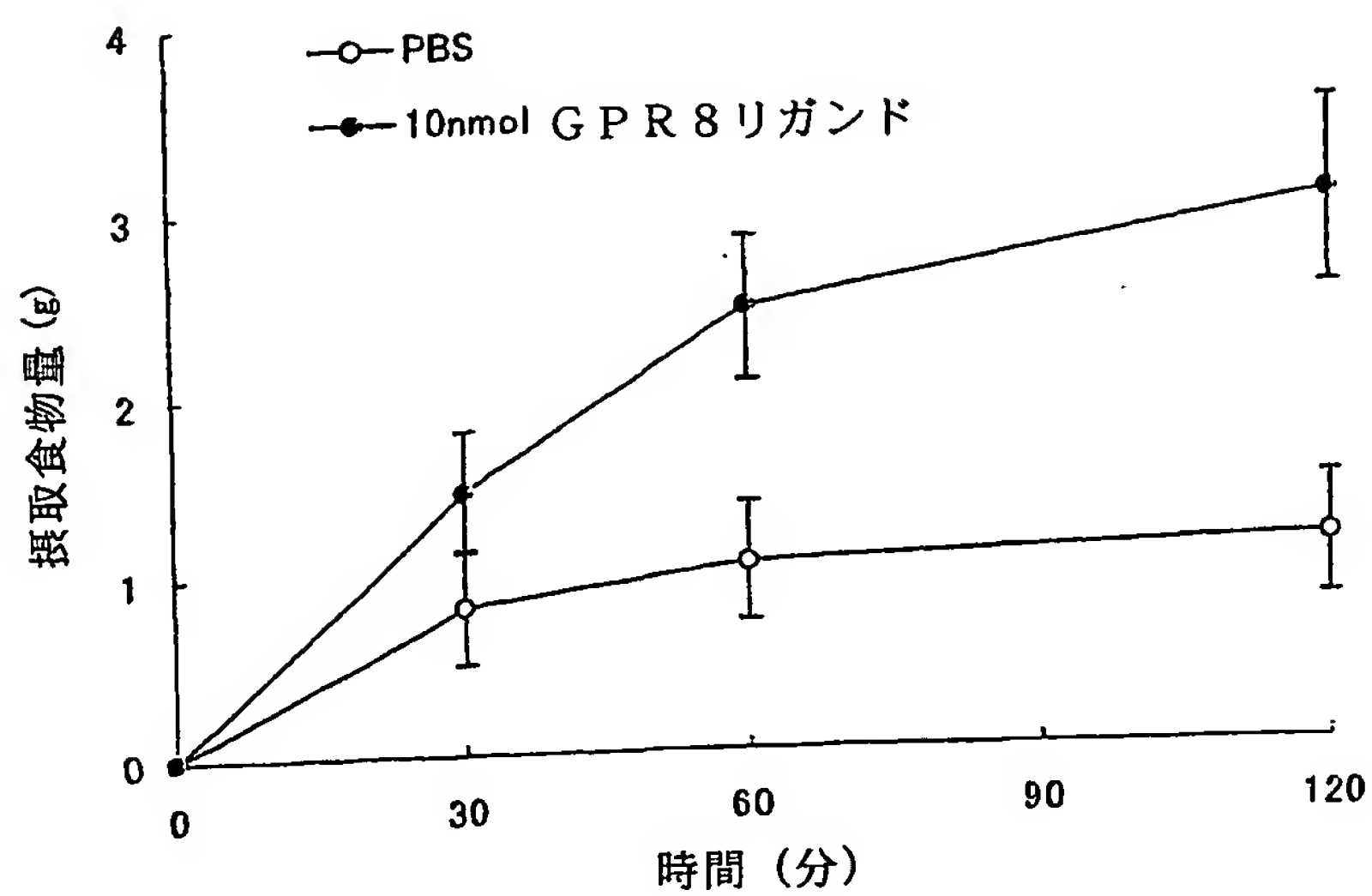
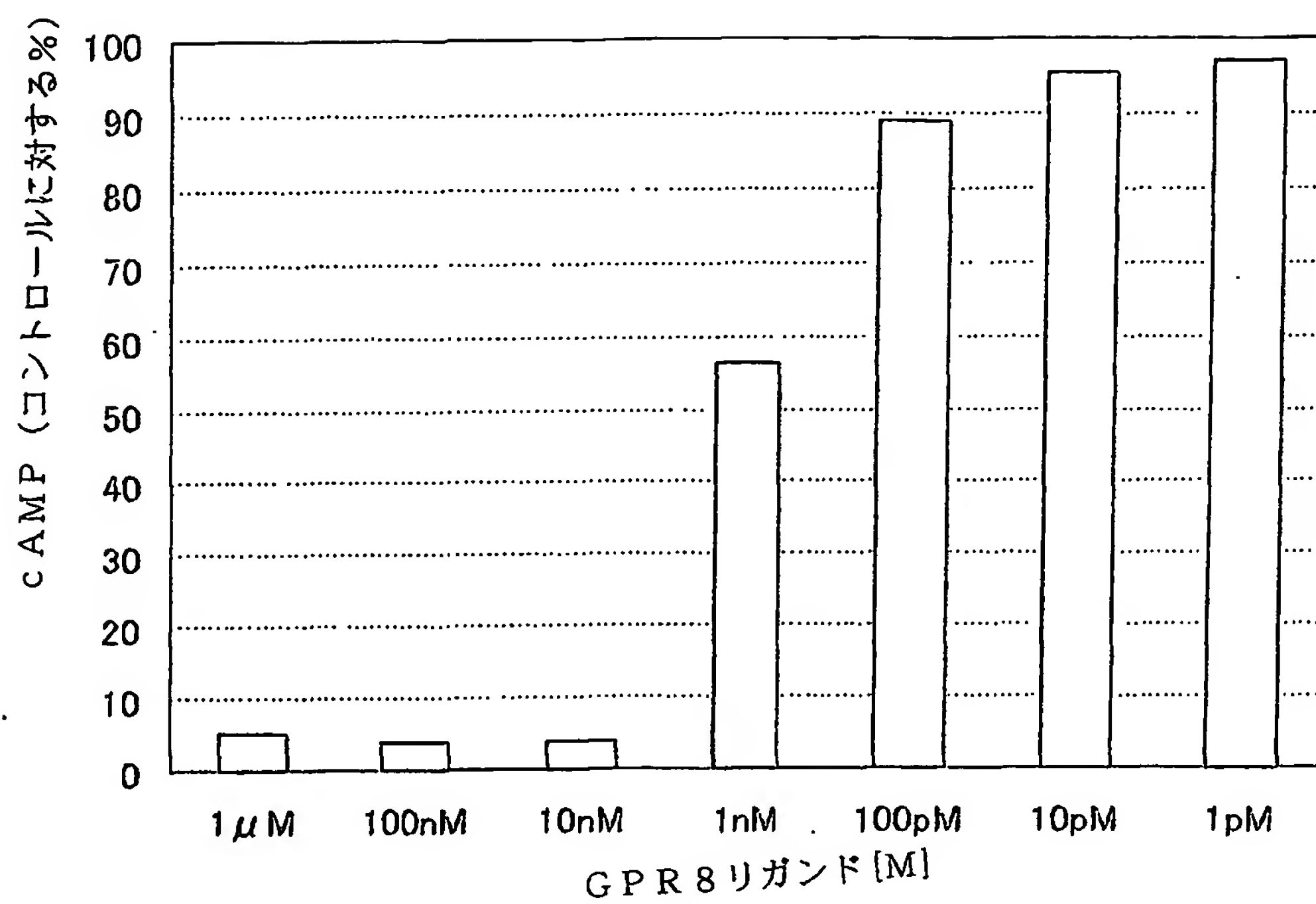


図 7



8/13

 8

GGC GGC GCC ACC GAG CGG TTA TAG CTG GGC CTG CAG GGC ACC	42
CAC GGC TCG CCT CCA GCC TCC TGC GCT CCG GTA CCT GGG CGT CCC AAC TCC ACT GCG CGC	102
CCA AAC CCA GCC GAG CCG GTT CGT GGC CCG CCC CGC CGG GCG GCC GTC GAC GCG AGC GCC	162
CTG GCG TGG CGC CCA GGG GAG CGG GGG GCT CCC GCG AGC CGG CCG CGG CTG GCA CTG CTG	222
Leu Ala Trp Arg Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Ala Ser Arg Pro Arg Leu Ala Leu Leu	20
CTG CTT CTG CTC CTG CTG CCG CTG CCC TCC GGC GCG TGG TAC AAG CAC GTG GCG AGT CCC	282
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ser Gly Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro	40
CGC TAC CAC ACG GTG GGC CGC GCC GCT GGC CTG CTC ATG GGG CTG CGT CGC TCA CCC TAT	342
Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr	60
CTG TGG CGC CGC GCG CTG CGC GCG GCC GCC GGG CCC CTG GCC AGG GAC ACC CTC TCC CCC	402
Leu Trp Arg Arg Ala Leu Arg Ala Ala Ala Gly Pro Leu Ala Arg Asp Thr Leu Ser Pro	80
GAA CCC GCA GCC CGC GAG GCT CCT CTC CTG CTG CCC TCG TGG GTT CAG GAG CTG TGG GAG	462
Glu Pro Ala Ala Arg Glu Ala Prp Leu Leu Leu Pro Ser Trp Val Gln Glu Leu Trp Glu	100
ACG CGA CGC AGG AGC TCC CAG GCA GGG ATC CCC GTC CGT GCG CCC CGG AGC CCG CGC GCC	522
Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Ala Gly Ile Pro Val Arg Ala Pro Arg Ser Pro Arg Ala	120
CCA GAG CCT GCG CTG GAA CCG GAG TCC CTG GAC TTC AGC GGA GCT GGC CAG AGA CTT CGG	582
Pro Glu Pro Ala Leu Glu Pro Glu Ser Leu Asp Phe Ser Gly Ala Gly Gln Arg Leu Arg	140
AGA GAC GTC TCC CGC CCA GCG GTG GAC CCC GCA GCA AAC CGC CTT GGC CTG CCC TGC CTG	642
Arg Asp Val Ser Arg Pro Ala Val Asp Pro Ala Ala Asn Arg Leu Gly Leu Pro Cys Leu	160
GCC CCC GGA CCG TTC TGA CAG CGT CCC CCG CCC GCC CGT GGC GCC TCC GCG CCT GAC CCA	702
Ala Pro Gly Pro Phe ***	165
GGA GGA GTG GCC GCG CG	719

9/13

 9

CC TCC GGA GCC AGT TCC TGG TCC GCC CCG CCG GGA GCC GTC AGC	44
ATG AAC CCC CGG GCA CGC GGC ATG GGA GCG CCG GGC CCG GGA CCG GGG GCC ACT GCG AGG	104
Met Asn Pro Arg Ala Arg Gly Met Gly Ala Arg Gly Pro Gly Pro Gly Ala Thr Ala Arg	20
CGC CGG CTG CTG GCA TTG CTG TTA CTG CTG CTG CTG CTG CCG CTG CCC GCC CGT GCC	164
Arg Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Arg Ala	40
TAC AAG CAC ACG GCG AGT CCC CGC TAC CAC ACG GTG GGC CGC GCC GCG GGC CTG CTC ATG	224
Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met	60
GGG CTG CGC CGC TCG CCC TAC ATG TGG CGC CGC GCG CTG CGC CCG GCG GCC GGG CCC CTG	284
Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Met Trp Arg Arg Ala Leu Arg Pro Ala Ala Gly Pro Leu	80
GCC TGG GAC ACT TTC GGC CAG GAC GTG CCC CCT CGG GGA CCC TCC GCC AGG AAC GCC CTC	344
Ala Trp Asp Thr Phe Gly Gln Asp Val Pro Pro Arg Gly Pro Ser Ala Arg Asn Ala Leu	100
TCT CCG GGG CCC GCC CCT CGC GAC GCT CCG CTG CTT CCC CCC GGG GTT CAG ACA CTG TGG	404
Ser Pro Gly Pro Ala Pro Arg Asp Ala Pro Leu Leu Pro Pro Gly Val Gln Thr Leu Trp	120
CAG GTG CGA CGC GGA AGC TTC CGC TCC GGG ATC CCG GTC AGT GCG CCC CGC AGC CCG CGC	464
Gln Val Arg Arg Gly Ser Phe Arg Ser Gly Ile Pro Val Ser Aal Pro Arg Ser Pro Arg	140
GCC CCG GGG TCC GAG CCG CAA CCG GAA TTG GGC GCC TCT TCC TGG ACC TCG GCG GAG TAG	524
Ala Arg Gly Ser Glu Pro Gln Pro Glu Leu Gly Ala Ser Ser Trp Thr Ser Ala Glu ***	159
ACC AGA GCC TTC GGA GAG TCT TCA GCT CAG CCG TGG TCT GC	565

10/13

☒ 10

TGT AGT CGC ACC AAC TGA CTA GTC TCT TCC ATC CTC	36
CGG AGC TCC GAC GTT CTC GGG GAC ATA AAC CCT GTT CTT GTC CTA ACC CGC CAA GGG GCC	96
ATG GAC TTG AGC GCG CTG GCG TCG AGC AGA GAA GTA CGG GGC CCT GGG CCC GGG GCT CCG	156
Met Asp Leu Ser Ala Leu Ala Ser Ser Arg Glu Val Arg Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro	20
GTG AAC CGG CCC CTG CTA CCG CTA CTG CTG CTT CTG CTC TTG CTA CCT CTG CCC GCC AGC	216
Val Asn Arg Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Ser	40
GCC TGG TAC AAG CAC GTG GCG AGC CCT CGC TAT CAC ACA GTG GGT CGT GCC TCC GGG CTG	276
Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu	60
CTC ATG GGG CTG CGC CGC TCG CCC TAC CTG TGG CGC CGT GCC TTG GGT GGG GCC GCT GGA	336
Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Gly	80
CCG CTC GTG GGG CTC CCG GGA CAG ATG GCC CGC AGC GCT CTC CTG CTT CCT TCC CCC GGG	396
Pro Leu Val Gly Leu Pro Gly Gln Met Ala Arg Ser Ala Leu Leu Leu Pro Ser Pro Gly	100
CAG GAG CTG TGG GAG GTA CGA AGC AGG AGT TCA CCG GCA GGA CTT CCC GTG CAT GCA ACC	456
Gln Glu Leu Trp Glu Val Arg Ser Arg Ser Ser Pro Ala Gly Leu Pro Val His Ala Thr	120
CGG AGT CTG CGG GAC CTG GAG GGA GCC GGC CAA CCT GAG CAG TCG CTA AGC TTT CAG TCC	516
Arg Ser Leu Arg Asp Leu Glu Gly Ala Glu Gln Pro Glu Gln Ser Leu Ser Phe Gln Ser	140
TGG ACT TCA GCA GAG CCC GCT GCT AGA GCC TTC GGT GAG ACG CTT CGT GCC CAG CCA TGG	576
Trp Thr Ser Ala Glu Pro Ala Ala Arg Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Trp	160
TTC CTG CAG CAA ATC ATC TTT GCC GAT CCT GTC AGG CTC GAC GAC CGT CTC AAG AAC CGA	636
Phe Leu Gln Gln Ile Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Leu Asp Asp Arg Leu Lys Asn Arg	180
TGG CGC CCC CGT GCT TGA CCT AAG CAG GAG CAC AGC TTG TAG CTC CAG	684
Trp Arg Pro Arg Ala ***	185

11/13

 11

TGA CTG GTC TCC ATC CTC TGG AGC TCC GAC GTG CTC GTT	39
CTC GGA GAC ATA AAC CCA GTT CTT GTC CTA ACC CTC CAA GGG GCA ATT GAC GTG AGC GCG	99
CTG GCG TCT AAC AGA GAA GTA CGG GGC CCT GGG CCC GGG ACT CCC AGG AAC CGG CCC CTG	159
Leu Ala Ser Asn Arg Glu Val Arg Gly Pro Gly Pro Gly Thr Pro Arg Asn Arg Pro Leu	20
CTG CCC CTG CTG CTG CTT CTG CTC TTG CTA CCG CTG CCC GCC AGC GCG TGG TAT AAG CAC	219
Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Ser Ala Trp Tyr Lys His	40
GTG GCG AGT CCC CGC TAT CAC ACA GTG GGT CGT GCC TCC GGG CTG CTC ATG GGG CTG CGC	279
Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg	60
CGC TCG CCC TAC CAG TGG CGC CGT GCC CTG GGC GGG GCT GCT GGA CCC CTC TCC CGG CTC	339
Arg Ser Pro Tyr Gln Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Gly Pro Leu Ser Arg Leu	80
CCA GGA CCG GTC GCC CGC GGC GCT CTC CTG CTT CCT TCC TCA GGG CAG GAG CTG TGG GAG	399
Pro Gly Pro Val Ala Arg Gly Ala Leu Leu Leu Pro Ser Ser Gly Gln Glu Leu Trp Glu	100
GTA CGA AGC AGG AGC TCA CCT GCA GGG CTT CCC GTC CAT GCA CCC TGG AGT CCG CGG GAC	459
Val Arg Ser Arg Ser Ser Pro Ala Gly Leu Pro Val His Ala Pro Trp Ser Pro Arg Asp	120
CTG GAG GGA GTC CGC CAA CCG GAG CAG TCG CTA AGC CTT CAC TCC TGG ATC TCA GAG GAG	519
Leu Glu Gly Val Arg Gln Pro Glu Gln Ser Leu Ser Leu His Ser Trp Ile Ser Glu Glu	140
CCC GCT GCT AGA GCC TTC GGA GAG ACG CTT CGT GCC CAG CCA TGG TTC CTG CAG CAA GTC	579
Pro Ala Ala Arg Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Trp Phe Leu Gln Gln Val	160
ATC TTT GCC GAT CCT GTC AGG CCC AAG AAC CGA TGG CGC CCC CAT GCT TGA CCT AGG CAG	639
Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Pro Lys Asn Arg Trp Arg Pro His Ala ***	176
GAG CAC AGC TTG AAG CTC CA	659

図 12

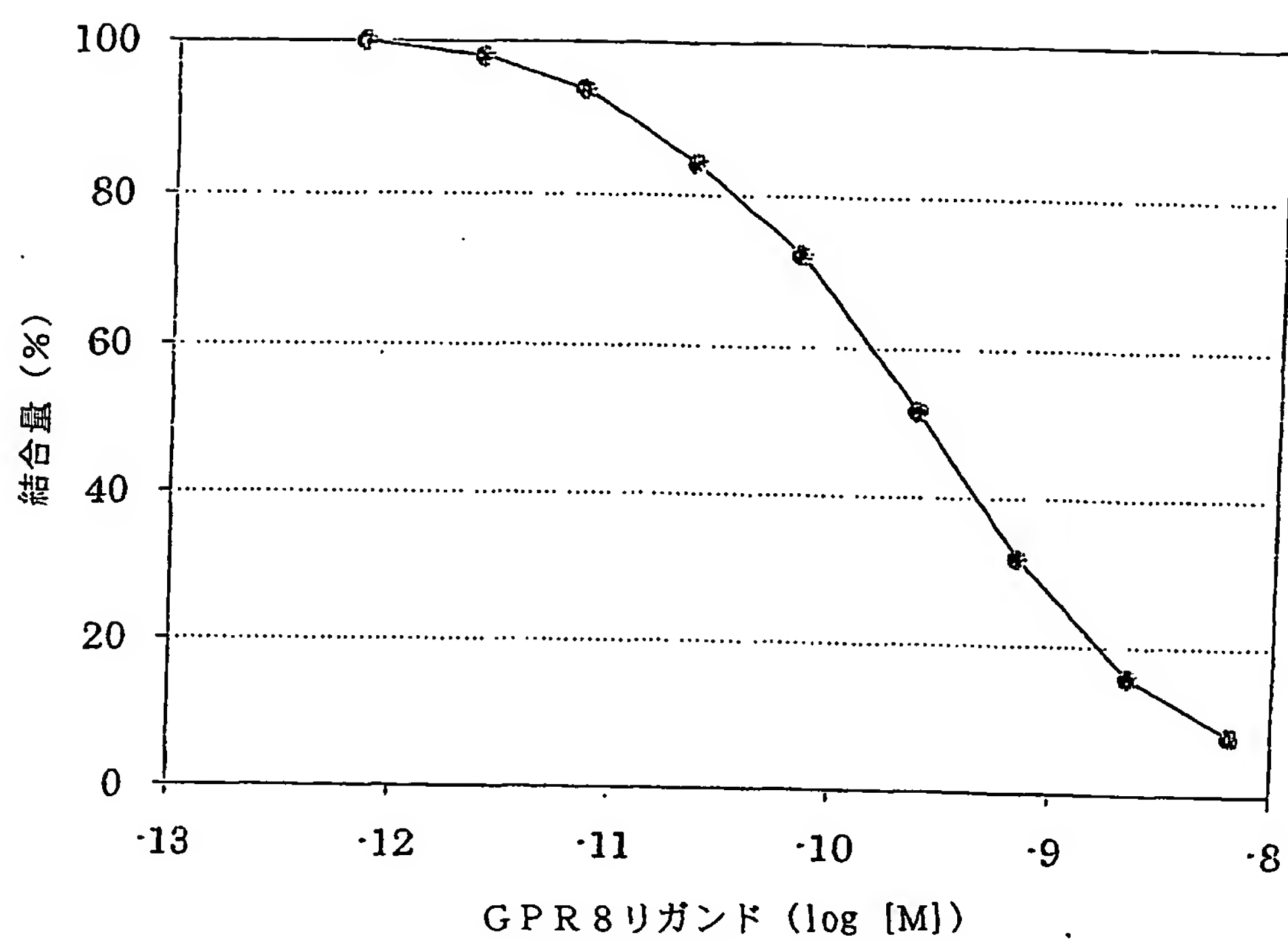
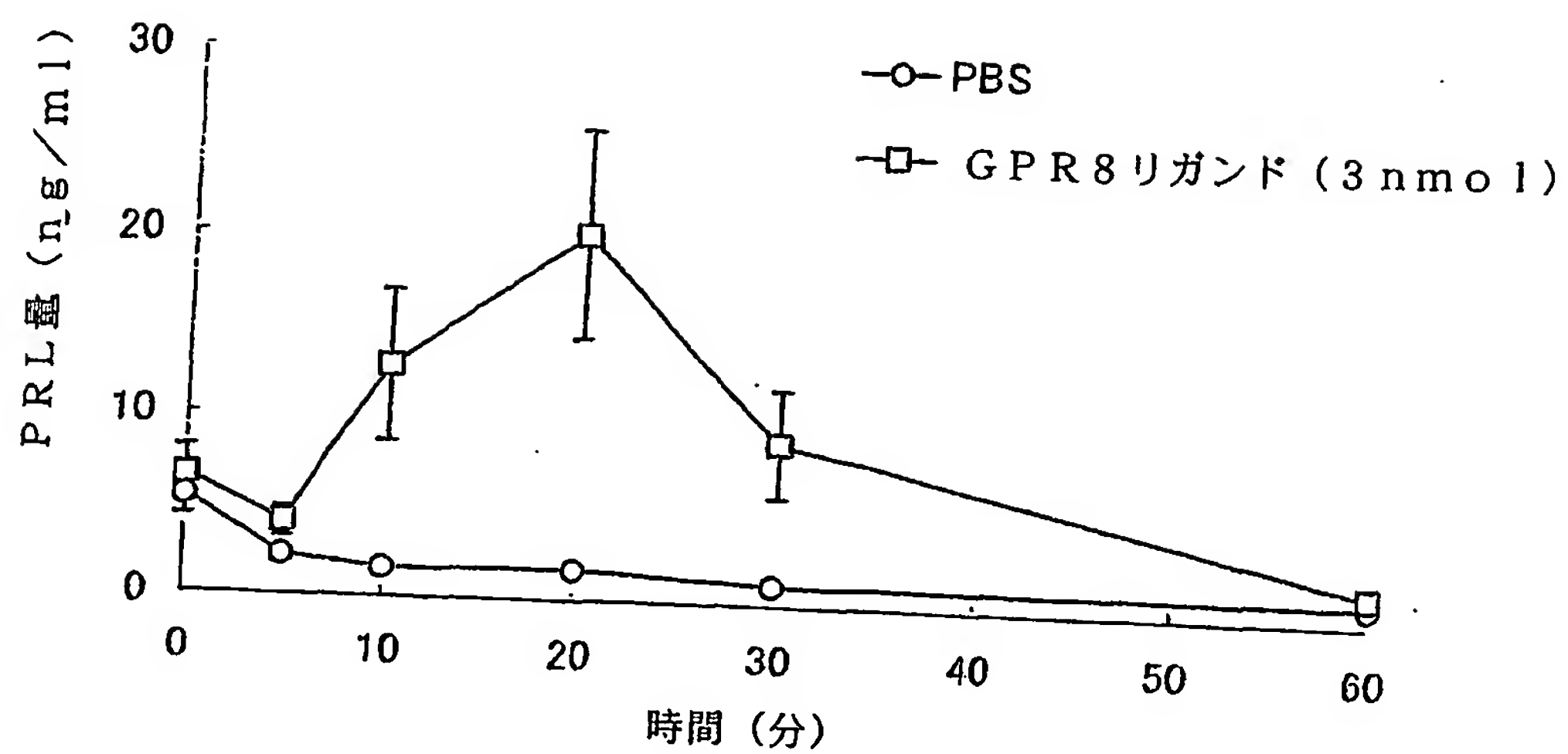


図 13



[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Ligand for GPR8 and its DNA

<130> P2001-121PCT

<150> JP 2000-191089

<151> 2000-06-21

<150> JP 2000-275013

<151> 2000-09-06

<150> JP 2001-116000

<151> 2001-04-13

<160> 125

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

atcgattaca atgcaggccg ctgggcaccc ag 32

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

actagtgcc ttcagcaccc caatatgctg cg 32

<210> 3

<211> 1023

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

```
atcgattaca atgcaggccg ctgggcaccc agagccccctt gacagcaggg gctccttctc 60
cctccccacg atgggtgcca acgtctctca ggacaatggc actggccaca atgccacctt 120
ctccgagcca ctgccgttcc tctatgtgct cctgcccgcc gtgtactccg ggatctgtgc 180
tgtggggctg actggcaaca cggccgtcat ccttgtaatc ctaagggcgc ccaagatgaa 240
gacggtgacc aacgtgttca tcctgaacct ggccgtcgcc gacgggctct tcacgttgtt 300
actgcccgtc aacatcgccg agcacctgct gcagtactgg cccttcgggg agctgctctg 360
caagctgggtg ctggccgtcg accactacaa catcttctcc agcatctact tcctagccgt 420
gatgagcgtg gaccgatacc tgggtgtgct ggccaccgtg aggtcccgcc acatgccctg 480
gcgcacctac cggggggcga aggtcgccag cctgtgtgtc tggctgggcg tcacggtcct 540
ggttctgccc ttcttctctt tcgctggcgt ctacagcaac gagctgcagg tcccaagctg 600
tgggctgagc ttcccgtggc ccgagcaggt ctgggtcaag gccagccgtg tctacacgtt 660
ggtcctgggc ttctgtgtgc ccgtgtgcac catctgtgtg ctctacacag acctcctgcg 720
caggctgcgg gccgtgcggc tccgtcttgg agccaagget ctaggcaagg ccaggcggaa 780
ggtgaccgtc ctggtcctcg tcgtgtgtgc cgtgtgcctc ctctgttga cgcccttcca 840
cctggcctct gtcgtggccc tgaccacgga cctgccccag accccactgg tcatcagtat 900
gtcctacgtc atcaccagcc tcagctacgc caactcgtgc ctgaaccctt tcctctacgc 960
ctttctagat gacaacttcc ggaagaactt ccgcagcata ttgcggtgct gaagggcact 1020
agt 1023
```

<210> 4

<211> 333

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Gln Ala Ala Gly His Pro Glu Pro Leu Asp Ser Arg Gly Ser Phe

1		5		10		15									
Ser	Leu	Pro	Thr	Met	Gly	Ala	Asn	Val	Ser	Gln	Asp	Asn	Gly	Thr	Gly
			20					25					30		
His	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Pro	Phe	Leu	Tyr	Val	Leu	Leu
		35					40					45			
Pro	Ala	Val	Tyr	Ser	Gly	Ile	Cys	Ala	Val	Gly	Leu	Thr	Gly	Asn	Thr
	50					55					60				
Ala	Val	Ile	Leu	Val	Ile	Leu	Arg	Ala	Pro	Lys	Met	Lys	Thr	Val	Thr
65					70				75						80
Asn	Val	Phe	Ile	Leu	Asn	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu
			85					90					95		
Val	Leu	Pro	Val	Asn	Ile	Ala	Glu	His	Leu	Leu	Gln	Tyr	Trp	Pro	Phe
		100					105					110			
Gly	Glu	Leu	Leu	Cys	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Asp	His	Tyr	Asn	Ile
	115					120					125				
Phe	Ser	Ser	Ile	Tyr	Phe	Leu	Ala	Val	Met	Ser	Val	Asp	Arg	Tyr	Leu
	130					135					140				
Val	Val	Leu	Ala	Thr	Val	Arg	Ser	Arg	His	Met	Pro	Trp	Arg	Thr	Tyr
145					150				155						160
Arg	Gly	Ala	Lys	Val	Ala	Ser	Leu	Cys	Val	Trp	Leu	Gly	Val	Thr	Val
			165					170				175			
Leu	Val	Leu	Pro	Phe	Phe	Ser	Phe	Ala	Gly	Val	Tyr	Ser	Asn	Glu	Leu
		180					185					190			
Gln	Val	Pro	Ser	Cys	Gly	Leu	Ser	Phe	Pro	Trp	Pro	Glu	Gln	Val	Trp
	195					200					205				
Phe	Lys	Ala	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Leu	Val	Leu	Gly	Phe	Val	Leu	Pro
	210					215					220				
Val	Cys	Thr	Ile	Cys	Val	Leu	Tyr	Thr	Asp	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg
225				230					235					240	
Ala	Val	Arg	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala	Lys	Ala	Leu	Gly	Lys	Ala	Arg	Arg
			245					250				255			
Lys	Val	Thr	Val	Leu	Val	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Val	Cys	Leu	Leu	Cys
		260					265				270				
Trp	Thr	Pro	Phe	His	Leu	Ala	Ser	Val	Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Leu
	275					280					285				
Pro	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Ile	Ser	Met	Ser	Tyr	Val	Ile	Thr	Ser	Leu

290	295	300	
Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp			
305	310	315	320
Asp Asn Phe Arg Lys Asn Phe Arg Ser Ile Leu Arg Cys			
	325	330	333

<210> 5

<211> 687

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Riboprobe

<400> 5

```

caaaagcugg agcuccaccg cgguggcggc cgcucuagcc cacuagugcc cuucagcacc 60
gcaauaugcu gcggaaguuc uuccggaagu ugucaucuag aaaggcguag aggaaggggu 120
ucaggcacga guuggcguag cugaggcugg ugaugacgua ggacauacug augaccagug 180
gggucugggg cagguccgug gucagggcca cgacagaggc cagguggaag ggcguccagc 240
agaggaggca cacggccagc acgacgagga ccaggacggu caccuuccgc cuggccuugc 300
cuagagccuu ggcuccagag cggagccgca cggcccgcag ccugcgcagg aggucugugu 360
agagcacaca gauggugcac acgggcagca cgaagcccag gaccaacgug uagacacggc 420
uggccuugaa ccagaccugc ucgggccacg ggaagcucag cccacagcuu gggaccugca 480
gcucguugcu guagacgcca gcgaaagaga agaagggcag aaccaggacc gugacgcca 540
gccagacaca caggcuggcg accuucgccc cccggguaggu gcgccagggc auguggcggg 600
accucacggu ggccagcacc accagguauc gguccacgcu caucacggcu aggaaguaga 660
ugcuggagaa gauguuguag uggucga 687

```

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<223> Porcine

<400> 6

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15
Ala
17

<210> 7
<211> 438
<212> DNA
<213> Human

<400> 7
gccccatgag caggccagcg gcgcggccca ccgtgtggta gcggggactc gccacgtgct 60
tgtaccacgc gccggagggc agcggcagca ggagcagaag cagcagcagt gccagccgcg 120
gccggctcgc gggagccccc cgtccccctg ggcgccacgc cagggcgctc gcgtcgacgg 180
ccgcccggcg gggcgggcca cgaaccggct cggctggggg tgggcgcgca gtggagttag 240
gacgcccagg taccggagcg caggaggctg gaggcgagcc gtgggtcccc tgcaggccca 300
gctataaccg ctcggtggcc ccgcctcggt ccgccccctc agtaccgctg ggctccccag 360
atggggggag ggacggaggg aggagaggga accctggcag ctggcggNgg acgtgggtac 420
ttgagcacct cactgagt 438

<210> 8
<211> 264
<212> DNA
<213> Human

<400> 8
gatagggtag gcgacgcagc cccatgagca ggccagcggc gcggcccacc gtgtggtagc 60
ggggactcgc cacgtgcttg taccacgcgc cggagggcag cggcagcagg agcagaagca 120
gcagcagtgc cagccgcggc cggctcgcgg gagccccccg ctcccctggg cgccacgcca 180
gggcgctcgc gtcgacggcc gcccggcggg gcggggccac aaccggctcg gctgggtttg 240
ggcgcgcagt ggagttagga cgcc 264

<210> 9
<211> 424
<212> DNA
<213> Human

<400> 9

```
gatagggtagc ggcacgcagc cccatgagca ggccagcggc gcggcccacc gtgtggtagc 60
ggggactcgc cacgtgcttg taccacgcgc cggagggcag cggcagcagg agcagaagca 120
gcagcagtagc cagccgcggc cggctcgcgg gagccccccg ctccccctggg cgccacgcca 180
gggcgctcgc gtcgacggcc gcccggcggg gcggggccacg aaccggctcg gctgggtttg 240
ggcgcgtagt ggagttggga cggccaggta ccggagcgca ggaggctgga ggcgagccgt 300
gggtccccctg caggcccagc tataaccgct cggtagggccc gcctcgttcc gccccctcag 360
taccgctggg ctccccagat ggggggaggg acggagggag gagagggaac cctggcagct 420
ggcg 424
```

<210> 10

<211> 375

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

```
gcgcctcacc gtgtggtagc ggggactcgc cacgtgcttg taccacgcgc cggaggcagc 60
ggcacgagga gcagaagcag cagcagtgcc agccgcggcc ggctcgcggg agccccccgc 120
tccccctggg gccacgcagg gctacagcgt cgacggccgc ccgcggggcc atcgcaaccg 180
gctcggctgg gtttggggcg gcagtgaggt tgggacgcc aggtaccgga gcgcaggagg 240
ctggaggcga gccgtgggtc ccctgcaggc ccagctataa ccgctcgttg gccccgcctc 300
gttccgcccc ctacgtaccg ctgggctccc cagaatgggg gagggacgga gggaggagag 360
ggaaccctgg cagct 375
```

<210> 11

<211> 260

<212> DNA

<213> Human

<400> 11

```
cnacgttctc ggggacataa accctgttct tgtcctaacc cgccaagggg ccatggactt 60
nagcgcgctg gcgtcgagca gagaagtacg gggccctggg ccggggctcc ggtgaaccgg 120
ccccctgtac cgctactgct gcttctnctc ttgctacctc tgcccggcag cgccctgttac 180
aagcacgtng cgagccctcg ctatcacaca gtingtcgtg cctccgggct gctcatnggg 240
ctgcgccgnt cgtcctacct 260
```

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

aactccactg cgcgcccaaa ccca 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

tctcccacag ctccctgaacc cacg 24

<210> 14

<211> 375

<212> DNA

<213> Human

<400> 14

aactccactg cgcgcccaaa cccagccgag ccggttcgtg gcccgccccg ccgggcggcc	60
gtcgacgcga gcgccctggc gtggcgccca ggggagcggg gggctcccgc gagccggccg	120
cggctggcac tgctgctgct tctgctcctg ctgccgctgc cctccggcgc gtggtacaag	180
cacgtggcga gtccccgcta ccacacgggtg ggccgcgccg ctggcctgct catggggctg	240
cgtcgctcac cctatctgtg gcgccgcgcg ctgcgcgcgg ccgccgggcc cctggccagg	300
gacaccctct cccccgaacc cgcagccgcg gaggtcctc tcctgctgcc ctcgtgggtt	360
caggagctgt gggag	375

<210> 15
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 15

Asn	Ser	Thr	Ala	Arg	Pro	Asn	Pro	Ala	Glu	Pro	Val	Arg	Gly	Pro	Pro
1				5					10					15	
Arg	Arg	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Ser	Ala	Leu	Ala	Trp	Arg	Pro	Gly	Glu
			20					25					30		
Arg	Gly	Ala	Pro	Ala	Ser	Arg	Pro	Arg	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
	35						40				45				
Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro	Ser	Gly	Ala	Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser
	50					55				60					
Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu
65					70					75					80
Arg	Arg	Ser	Pro	Tyr	Leu	Trp	Arg	Arg	Ala	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly
			85						90					95	
Pro	Leu	Ala	Arg	Asp	Thr	Leu	Ser	Pro	Glu	Pro	Ala	Ala	Arg	Glu	Ala
			100					105					110		
Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Trp	Val	Gln	Glu	Leu	Trp	Glu			
		115					120					125			

<210> 16
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 16

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ala	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu									
			20			23									

<210> 17
 <211> 30

<212> PRT
<213> Human

<400> 17
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp
 20 25 30

<210> 18
<211> 69
<212> DNA
<213> Human

<400> 18
tgggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctg 69

<210> 19
<211> 90
<212> DNA
<213> Human

<400> 19
tgggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgctcacc ctatctgtgg 90

<210> 20
<211> 29
<212> PRT
<213> Human

<400> 20
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu

20

25

29

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr

20

25

28

<210> 22

<211> 27

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro

20

25

27

<210> 23

<211> 26

<212> PRT

<213> Human

<400> 23

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser

20

25

26

<210> 24

<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 24
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg
20 25

<210> 25
<211> 24
<212> PRT
<213> Human

<400> 25
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg
20 24

<210> 26
<211> 87
<212> DNA
<213> Human

<400> 26
tgggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgctcacc ctatctg 87

<210> 27
<211> 84
<212> DNA
<213> Human

<400> 27

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgtcacc ctat 84

<210> 28
<211> 81
<212> DNA
<213> Human

<400> 28
tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgtcacc c 81

<210> 29
<211> 78
<212> DNA
<213> Human

<400> 29
tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgtca 78

<210> 30
<211> 75
<212> DNA
<213> Human

<400> 30
tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgc 75

<210> 31
<211> 72
<212> DNA
<213> Human

<400> 31

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gt 72

<210> 32

<211> 999

<212> DNA

<213> Human

<400> 32

atgcaggccg ctgggcaccc agagcccctt gacagcaggg gctccttctc cctccccacg 60
atgggtgcc aacgtctctca ggacaatggc actggccaca atgccacctt ctccgagcca 120
ctgccgttcc tctatgtgct cctgcccgcc gtgtactccg ggatctgtgc tgtggggctg 180
actggcaaca cggccgtcat ccttgtaatc ctaagggcgc ccaagatgaa gacggtgacc 240
aacgtgttca tcctgaacct ggccgtcgcc gacgggctct tcacgtgtgt actgcccgtc 300
aacatcgccg agcacctgct gcagtactgg cccttcgggg agctgctctg caagctgtgt 360
ctggccgtcg accactacaa catcttctcc agcatctact tcctagccgt gatgagcgtg 420
gaccgatacc tgggtgtgct ggccaccgtg aggtcccgcc acatgccctg gcgcacctac 480
cggggggcga aggtcgccag cctgtgtgtc tggctgggcg tcacggtcct ggttctgccc 540
ttcttctctt tcgctggcgt ctacagcaac gagctgcagg tccaagctg tgggctgagc 600
ttcccgtggc ccgagcgggt ctgggtcaag gccagccgtg tctacacttt ggtcctgggc 660
ttcgtgctgc ccgtgtgcac catctgtgtg ctctacacag acctcctgcg caggctgcgg 720
gccgtgcggc tccgctctgg agccaaggct ctaggcaagg ccaggcggaa ggtgaccgtc 780
ctggtcctcg tcgtgctggc cgtgtgcctc ctctgctgga cgcccttcca cctggcctct 840
gtcgtggccc tgaccacgga cctgccccag accccactgg tcatcagtat gtcctacgtc 900
atcaccagcc tcacgtacgc caactcgtgc ctgaaccctt tcctctacgc ctttctagat 960
gacaacttcc ggaagaactt ccgcagcata ttgcggtgc 999

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

tctccacag ctcctgaacc cacg 24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

acagataggg tgagcgacgc agcc 24

<210> 35

<211> 1102

<212> DNA

<213> Human

<400> 35

gccatttaag tggagtcttg aaggatgagt aggtgttagg cacagacgca cagaggcagg 60
caaagccaca ggctgttggg ttaggcaaaa attgagactg gctggataaa gtggtcttgg 120
gggaccatca ccagagagga ggcgctggag gtctgcaagg ccttgtcctg cccctccagg 180
ggtagagggt ccaggagggg ctgacttttt ctcctggaag cctcacagaa ctgcagaccc 240
cacggatggc ttggtgttgc caacatgagg ctcttaaggc ttctgcgggg agatgggttg 300
gtggggagaa gctgggggtg gcagtggaca ggacagggtg tggggacagc tttgggagct 360
atgctaggca aggacaaggg acaactcttg gggggactca cccagagggg tcttgaatgg 420
tgctgaaggc ccccgacagc cctcctgcaa tagccactgt agctctgcct gcacctgggc 480
cttcgctctg ctgtcgtccc accggcagga gtctggctaa aggggcatcc ctgagcccta 540
ctccctcatc agtgttccca gtaccactc cctggcactt ccactcctag agggaggagg 600
ctgagcaggc agagaatggg acgtgtcccc tcagaggagc ctgagccca gticcagcca 660
gcggccact cagtgagggt ctcaagtacc cacgtcccc gccagctgcc agggttccct 720
ctcctccctc cgtccctccc cccatctggg gagcccagcg gtactgaggg ggcggaacga 780
ggcggggcca ccgagcggtt atagctgggc ctgcaggga cccacggctc gcctccagcc 840
tcctgcgctc cggtacctgg gcgtcccaac tccactgcgc gcccaaacc agccgagccg 900
gttcgtggcc cgccccgccg ggcggccgtc gacgcgagcg ccttggcgtg gcgcccaggg 960
gagcgggggg ctcccgcgag ccggccgcgg ctggcactgc tgctgcttct gctcctgctg 1020

ccgctgccct ccggcgctg gtacaagcac gtggcgagtc cccgctacca cacggtgggc 1080
cgcgccgctg gcctgctcat gg 1102

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

aactccactg cgcgcccaaa ccca 24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

ctggcactgc tgctgcttct gctc 24

<210> 38

<211> 609

<212> DNA

<213> Human

<400> 38

ctgctgccgc tgccctccgg cgcgtggtag aagcacgtgg cgagtcctcg ctaccacacg 60
gtgggccgcg ccgctggcct gctcatgggg ctgcgtcgct caccctatct gtggcgccgc 120
gcgctgcgcg cggccgcccgg gcccttggcc agggacaccc tctccccga accgcagcc 180
cgcgaggctc ctctcctgct gccctcgtgg gttcaggagc tgtgggagac gcgacgcagg 240
agctcccagg cagggatccc cgtccgttgc ccccgagacc cgcgcgcccc agagccttgc 300

ctggaaccgg agtccctgga cttcagcggg gctggccaga gacttcggag agacgtctcc 360
cgcccagcgg tggaccccgcc agcaaaccgc cttggcctgc cctgcctggc ccccgaccg 420
ttctgacagc gtcccccgcc cgcccgctggc gcctccgcgc ctgaccagcagg aggagtggcc 480
gcgcgcttcc aggagccgct catagacccc gcctgccgctc cggtaataa aatccgcctg 540
actcctgcgc ccccgcatgc gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agcggccgct 600
gaattctag 609

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 39

agcggtagtg agggggcgga acga 24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

gggtctatga gcggctcctg gaag 24

<210> 41

<211> 719

<212> DNA

<213> Human

<400> 41

ggcggggcca ccgagcgggt atagctgggc ctgcaggga cccacggctc gcctccagcc 60

```

tcctgcgctc cggtagctgg gcgtcccaac tccactgcgc gcccaaacc agccgagccg 120
gttcgtggcc cgccccgccg ggccggccgtc gacgcgagcg ccctggcgtg gcgcccaggg 180
gagcgggggg ctcccgcgag ccggccgcgg ctggcacigc tgctgcctct gctcctgctg 240
ccgctgccct ccggcgcgctg gtacaagcac gtggcgagtc cccgtacca cacggtgggc 300
cgcgccgctg gcctgctcat ggggctgcgt cgctcaccct atctgtggcg ccgcgcgctg 360
cgcgccggccg ccggggcccct ggccaggac accctctccc ccgaaccgc agcccgcgag 420
gctcctctcc tgctgccctc gtgggttcag gagctgtggg agacgcgacg caggagctcc 480
caggcaggga tcccgtccg tgcgccccgg agcccgcgcg cccagagcc tgcgctggaa 540
ccggagtccc tggacttcag cggagctggc cagagacttc ggagagacgt ctcccgccca 600
gcggtggacc ccgcagcaaa ccgccttggc ctgccctgcc tggcccccg accgttctga 660
cagcgtcccc cgcccgcccg tggcgctcc gcgcctgacc caggaggagt ggccgcgcg 719

```

<210> 42

<211> 165

<212> PRT

<213> Human

<400> 42

```

Leu Ala Trp Arg Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Ala Ser Arg Pro Arg
1           5           10           15
Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ser Gly Ala
          20           25           30
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
          35           40           45
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg Arg
          50           55           60
Ala Leu Arg Ala Ala Ala Gly Pro Leu Ala Arg Asp Thr Leu Ser Pro
65           70           75           80
Glu Pro Ala Ala Arg Glu Ala Pro Leu Leu Leu Pro Ser Trp Val Gln
          85           90           95
Glu Leu Trp Glu Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Ala Gly Ile Pro Val
          100          105          110
Arg Ala Pro Arg Ser Pro Arg Ala Pro Glu Pro Ala Leu Glu Pro Glu
          115          120          125
Ser Leu Asp Phe Ser Gly Ala Gly Gln Arg Leu Arg Arg Asp Val Ser
          130          135          140

```

Arg Pro Ala Val Asp Pro Ala Ala Asn Arg Leu Gly Leu Pro Cys Leu
145 150 155 160
Ala Pro Gly Pro Phe
 165

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

acagataggg tgagcgacgc agcc 24

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

tgagcgacgc agcccatga gcag 24

<210> 45

<211> 235

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 45

cgacaccct gcgcccagac cctccggagc cagttcctgg tccgccccgc cgggagccgt 60
cagcatgaac ccccgggcac gcggcatggg agcgcggggc ccgggaccgg gggccactgc 120
gaggcgccgg ctgctggcat tgctgttact gctgctgctg ctgccgctgc ccgcccgtgc 180

ctggtacaag cacacggcga gtccccgcta ccacacggtg ggccgcgccg cgggc 235

<210> 46
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 46
cagcggcagc agcagcagca gtaa 24

<210> 47
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 47
cagcagtaac agcaatgcca gcag 24

<210> 48
<211> 156
<212> DNA
<213> Porcine

<400> 48
ctgtagcctc ccgcgctgcg gcttcccgac acccctgcgc ccagaccctc cggagccagt 60
tcctggtccg ccccgccggg agccgtcagc atgaaccccc gggcacgcgg catgggagcg 120
cggggcccgg gaccgggggc cactgcgagg cgccgg 156

<210> 49
<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 49

cggctgctgg cattgctgtt actg 24

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 50

cgcccgtgcc tggtagaagc aca 23

<210> 51

<211> 588

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 51

cggcgagtc cgcctaccac acggtgggccc gcgcccgggg cctgctcatg gggctgcgcc 60
gctcgcccta catgtggcgc cgcgcgctgc gcccggcggc cgggcccctg gcctgggaca 120
ctttcggcca ggacgtgccc cctcggggac cctccgccag gaacgccctc tctccggggc 180
ccgcccctcg cgacgtccg ctgcttcccc ccgggggttca gacactgtgg caggtgcgac 240
gcggaagctt ccgctccggg atcccggta gtgcgccccg cagcccgcgc gcccggggt 300
ccgagccgca accggaattg ggcgcctctt cctggacctc ggcggagtag accagagcct 360
tcggagagtc ttcagctcag cggtaggtctg cgcagggaac cgccttcgcc agcccccgcc 420
tcgccccagc gtcagagccg acctgatcgc ggccccggcg gcgcggcccc gcgcctggcc 480
cccgcgagat ctcttcgcgc ccccaggccg gccgtctggt caataaaacc cgcctagttc 540
ctgcgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 588

<210> 52
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 52
ttcccgacac ccctgcgccc agac 24

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 53
gggctggcga aggcggttcc ctgc 24

<210> 54
<211> 565
<212> DNA
<213> Porcine

<400> 54
cctccggagc cagttcctgg tccgccccgc cgggagccgt cagcatgaac ccccgggcac 60
gcggcatggg agcgcggggc ccgggaccgg gggccactgc gaggcgccgg ctgctggcat 120
tgctgttact gctgctgctg ctgccgctgc ccgcccgtgc ctggtacaag cacacggcga 180
gtccccgcta ccacacggtg ggccgcgccc cgggcctgct catggggctg cgccgctcgc 240
cctacatgtg gcgccgcgcg ctgcgcccg gggccgggcc cctggcctgg gacactttcg 300
gccaggacgt gccccctcgg ggacctccg ccaggaacgc cctctctccg gggcccgccc 360
ctcgcgacgc tccgctgcct cccccggggg ttcagacact gtggcaggct cgacgcggaa 420

gcttccgctc cgggatcccg gtcagtgcgc cccgcagccc gcgcgcccgg gggtcggagc 480
 cgcaaccgga attgggcgcc tcttcttgga cctcggcgga gtagaccaga gccttcggag 540
 agtcttcagc tcagcgggtg tctgc 565

<210> 55

<211> 159

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 55

Met	Asn	Pro	Arg	Ala	Arg	Gly	Met	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly
1				5					10					15	
Ala	Thr	Ala	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
			20					25					30		
Leu	Pro	Leu	Pro	Ala	Arg	Ala	Trp	Tyr	Lys	His	Thr	Ala	Ser	Pro	Arg
		35					40					45			
Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu	Arg	Arg
	50					55					60				
Ser	Pro	Tyr	Met	Trp	Arg	Arg	Ala	Leu	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu
65					70					75				80	
Ala	Trp	Asp	Thr	Phe	Gly	Gln	Asp	Val	Pro	Pro	Arg	Gly	Pro	Ser	Ala
				85					90					95	
Arg	Asn	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Asp	Ala	Pro	Leu	Leu
			100					105					110		
Pro	Pro	Gly	Val	Gln	Thr	Leu	Trp	Gln	Val	Arg	Arg	Gly	Ser	Phe	Arg
		115					120					125			
Ser	Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Arg	Ala	Arg	Gly	Ser
	130					135					140				
Glu	Pro	Gln	Pro	Glu	Leu	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Thr	Ser	Ala	Glu	
145					150					155				159	

<210> 56

<211> 23

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 56

Trp	Tyr	Lys	His	Thr	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5				10					15		
Ala	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu									
			20			23									

<210> 57

<211> 30

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 57

Trp	Tyr	Lys	His	Thr	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5				10					15		
Ala	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Tyr	Met	Trp		
			20				25					30			

<210> 58

<211> 69

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 58

tggtacaagc	acacggcgag	tccccgctac	cacacggtgg	gccgcgccgc	gggcctgctc	60
atggggctg						69

<210> 59

<211> 90

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 59

tggtacaagc	acacggcgag	tccccgctac	cacacggtgg	gccgcgccgc	gggcctgctc	60
atggggctgc	gccgctcgcc	ctacatgttg				90

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 60

cgttctcggg gacataaac cctg 24

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 61

atgagcagc ccggaggcac gacc 24

<210> 62

<211> 188

<212> DNA

<213> Rat

<400> 62

ttcttgtcct aaccgccaa ggggccatgg acttgagcgc gctggcgtcg agcagagaag 60
tacggggccc tgggcccggg gctccggtga accggcccct gctaccgcta ctgctgcttc 120
tgctcttgct acctctgccc gccagcgcct ggtacaagca cgtggcgagc cctcgtatc 180
acacagtg 188

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 63

atgagcagcc cggaggcacg acc 23

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 64

actgtgtgat agcgagggt cgc 23

<210> 65

<211> 615

<212> DNA

<213> Rat

<400> 65

```
ctcagagctg tactaggcag gaagagggac ggccctcagg gaagggtggc cctatgctta 60
aaactttcct gtctcctctc cataagtgtt ccactttagt caactcctac caagggggca 120
tcctttttgcc cctggcagcc catccttgta ttctgagacc atgcatggta ccagaactcc 180
ctccctgaca gtcccttcc tgggggcgag gaaagggtaa gcaaggagat cccccactaa 240
agcttcaagc gcagtccagc ttgcgatcta ctcatlggga ggcttctagc taccgggtt 300
ccctcttctc cctccctctc catcctcctc tcccttgggc atgtgccgcg ggggcgagcc 360
ggggcggggc cattgagaag ctgtagtcgc accaactgac tagtctcttc catcctccgg 420
agctccgacg ttctcgggga cataaacctt gtcttctgtc taaccgcca aggggcatg 480
gacttgagcg cgctggcgic gagcagagaa gtacggggcc ctgggcccgg ggctccggtg 540
aaccggcccc tgctaccgtt actgtgtgtt ctgtctttgc tacctctgcc cgccagcgcc 600
tggtacaagc acgtg 615
```

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 66

cgttctcgg ggacataaac cctg 24

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 67

cgagccctcg ctatcacaca gtgg 24

<210> 68

<211> 497

<212> DNA

<213> Rat

<400> 68

```
gtcgtgcctc cgggctgctc atggggctgc gccgctcgcc ctacctgtgg cgccgtgcct 60
tgggtggggc cgctggaccg ctcgtagggc tcccgggaca gatggccgc agcgctctcc 120
tgcttccttc ccccgggcag gagctgtggg aggtacgaag caggagtcca ccggcaggac 180
ttcccgtgca tgcaaccggg agtctgcggg acctggaggg agccggccaa cctgagcagt 240
cgctaagctt tcagtcctgg acttcagcag agcccgtgc tagagccttc ggtgagacgc 300
ttcgtgcca gccatggttc ctgcagcaaa tcatctttgc cgatcctgtc aggctcgacg 360
accgtctcaa gaaccgatgg cgccccgtg cttagacctaa gcaggagcac agctttagc 420
tccagtcagg tctcgttgtc tggtaataa aatcactctg attcccaaaa aaaaaaaaaa 480
aaaaaaaaa aaaaaaa 497
```

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 69

ggggcggggc cattgagaag c 21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 70

tgaccagaca acgagacctg a 21

<210> 71

<211> 684

<212> DNA

<213> Rat

<400> 71

tgtagtcgca ccaactgact agtcctctcc atcctccgga gctccgacgt tctcggggac 60
ataaacctg ttcttgteet aaccgcca ggggccatgg acttgagcgc gctggcgctc 120
agcagagaag tacggggccc tgggcccggg gctccggtga accggccccct gctaccgcta 180
ctgctgcttc tgctcttgct acctctgccc gccagcgcct ggtacaagca cgtggcgagc 240
cctcgctatc acacagtggg tcgtgcctcc gggctgctca tggggctgcg ccgctcgccc 300
tacctgtggc gccgtgcctt ggggtggggcc gctggaccgc tcgtggggct cccgggacag 360
atggcccgcga gcgctctcct gcttccctcc cccgggcagg agctgtggga ggtacgaagc 420
aggagttcac cggcaggact tcccgtgcat gcaaccggga gctgcggga cctggaggga 480

gccggccaac ctgagcagtc gctaagcttt cagtcctgga cttcagcaga gcccgctgct 540
 agagcccttcg gtgagacgct tcgtgccag ccatggttcc tgcagcaaat catctttgcc 600
 gatcctgtca ggctcgacga ccgtctcaag aaccgatggc gccccgtgc ttgacctaaag 660
 caggagcaca gctttagct ccag 684

<210> 72

<211> 185

<212> PRT

<213> Rat

<400> 72

Met	Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Glu	Val	Arg	Gly	Pro	Gly
1				5					10					15	
Pro	Gly	Ala	Pro	Val	Asn	Arg	Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
				20				25					30		
Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro	Ala	Ser	Ala	Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser
			35				40					45			
Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala	Ser	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu
			50				55				60				
Arg	Arg	Ser	Pro	Tyr	Leu	Trp	Arg	Arg	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly
65					70					75					80
Pro	Leu	Val	Gly	Leu	Pro	Gly	Gln	Met	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Leu
				85					90					95	
Pro	Ser	Pro	Gly	Gln	Glu	Leu	Trp	Glu	Val	Arg	Ser	Arg	Ser	Ser	Pro
			100					105					110		
Ala	Gly	Leu	Pro	Val	His	Ala	Thr	Arg	Ser	Leu	Arg	Asp	Leu	Glu	Gly
			115				120					125			
Ala	Gle	Gln	Pro	Glu	Gln	Ser	Leu	Ser	Phe	Gln	Ser	Trp	Thr	Ser	Ala
			130				135					140			
Glu	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Phe	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Ala	Gln	Pro	Trp
145					150					155				160	
Phe	Leu	Gln	Gln	Ile	Ile	Phe	Ala	Asp	Pro	Val	Arg	Leu	Asp	Asp	Arg
				165					170				175		
Leu	Lys	Asn	Arg	Trp	Arg	Pro	Arg	Ala							
				180				185							

<210> 73

<211> 23

<212> PRT

<213> Rat

<400> 73

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ser	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu									
			20			23									

<210> 74

<211> 30

<212> PRT

<213> Rat

<400> 74

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ser	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Tyr	Leu	Trp		
			20				25						30		

<210> 75

<211> 69

<212> DNA

<213> Rat

<400> 75

tggtacaagc	acgtggcgag	ccctcgctat	cacacagtgg	gtcgtgcctc	cgggctgctc	60
atggggctg						69

<210> 76

<211> 90

<212> DNA

<213> Rat

<400> 76

tggtacaagc acgtggcgag ccctcgctat cacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60
atggggctgc gccgctcgcc ctacctgtgg 90

<210> 77

<211> 529

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 77

acgtgctcgt tctcggagac ataaaccag ttcttgtcct aaccctccaa ggggcaattg 60
acgtgagcgc gctggcgtct aacagagaag tacggggccc tggggccggg actcccagga 120
accggccctt gctgcccctg ctgctgcttc tgctcttgct accgctgccc gccagcgcct 180
ggtataagca cgtggcgagt ccccgctatc acacagtggg tcgtgcctcc gggctgctca 240
tggggctgcg ccgctcgccc taccagtggc gccgtgccct gggcggggct gctggacccc 300
tctcccggct cccaggaccg gtcgcccgcg gcgctctcct gcttcccttc tcagggcagg 360
agctgtggga ggtacgaagc aggagctcac ctgcagggtc tcccgccat gcaccctgga 420
gtccgcggga cctggaggga gtccgccaac cggagcagtc gctaagcctt cactcctgga 480
tgtcagagga gcccgctgat aggtaagtag gaaagagagg aggcgggcg 529

<210> 78

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 78

accagttct tgtcctaacc ctcc 24

<210> 79

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 79

ccigcttcgt accccccaca gctc 24

<210> 80

<211> 311

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 80

aaggggcaat tgacgtgagc gcgctggcgt ctaacagaga agtacggggc cctgggcccg 60
ggactcccag gaaccggccc ctgctgcccc tgctgtgct tctgctcttg ctaccgtgc 120
ccgccagcgc ctggtataag cacgtggcga gtccccgcta tcacacagtg ggtcgtgcct 180
ccgggtgct catggggctg cgccgtcgc cctaccagtg gcgccgtgcc ctgggcgggg 240
ctgctggacc cctctcccgg ctcccaggac cggtcgcccg cggcgctctc ctgcttcctt 300
cctcagggca g 311

<210> 81

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 81

catgagcagc ccggaggcac gacc 24

<210> 82

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 82

gtgatagcgg ggactcgcca cgtg 24

<210> 83

<211> 237

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 83

aaaggctgta gtcgcaccaa ctgactggc tccatcctct ggagctccga cgtgctcgtt 60
ctcggagaca taaaccagct tcttgctcta accctccaag gggcaattga cgtgagcgcg 120
ctggcgctta acagagaagt acggggccct gggcccggga ctcccaggaa ccggcccctg 180
ctgcccctgc tgctgcttct gctcttgcta ccgctgcccg ccagcgccctg gtataag 237

<210> 84

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 84

accagttct tgcctaacc ctcc 24

<210> 85

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 85

gggcaattga cgtgagcgcg ctgg 24

<210> 86

<211> 598

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 86

```
cgctaacag agaagtacgg ggccctgggc ccgggactcc caggaaccgg cccctgctgc   60
ccctgctgct gcttctgctc ttgctaccgc tgcccgccag cgcttggtat aagcacgtgg  120
cgagtcctccg ctatcacaca gtgggtcgtg cctccgggct gctcatgggg ctgcgccgct  180
cgccctacca gtggcgccgt gccctgggcg gggctgctgg accctctcc cggctcccag  240
gaccggctgc ccgcggcgct ctctgcttc ctctctcagg gcaggagctg tgggaggtac  300
gaagcaggag ctacactgca gggcttcccg tccatgcacc ctggagtccg cgggacctgg  360
agggagtccg ccaaccggag cagtcgctaa gccctcactc ctggatctca gaggagcccg  420
ctgctagagc cttcggagag acgcttcgtg cccagccatg gttcctgcag caagtcatt  480
ttgccgatcc tgtcaggccc aagaaccgat ggcgccccca tctttgacct aggcaggagc  540
acagcttgaa gctccagtca ggctcgtgt ttctgggtcaa taaaaccaac ctgattcc   598
```

<210> 87

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 87

```
aaaggctgta gtcgcaccaa c   21
```

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 88

accagaaaca cgaggcctga c 21

<210> 89

<211> 659

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 89

```

tgactggtct ccatcctctg gagctccgac gtgctcgttc tcggagacat aaaccagtt    60
cttgtcctaa ccctccaagg ggcaattgac gtgagcgcgc tggcgtctaa cagagaagta    120
cggggccctg ggcccgggac tcccaggaac cggcccctgc tgcccctgct gctgcttctg    180
ctcttgctac cgctgcccg cagcgccctgg tataagcacg tggcgagtc cgcctatcac    240
acagtgggtc gtgcctccgg gctgctcatg gggctgcgcc gctcgcccta ccagtggcgc    300
cgtgccctgg gcggggctgc tggacccctc tcccggctcc caggaccggt cgcccgcggc    360
gctctcctgc ttcttctc agggcaggag ctgtgggagg tacgaagcag gagctcacct    420
gcagggttc ccgtccatgc accctggagt ccgcgggacc tggagggagt ccgccaaccg    480
gagcagtcgc taagccttca ctcttgatc tcagaggagc ccgtgctag agccttcgga    540
gagacgttc gtgccagcc atggttcctg cagcaagtca tctttgccga tcctgtcagg    600
cccaagaacc gatggcgccc ccatgcttga cctaggcagg agcacagctt gaagctcca    659

```

<210> 90

<211> 176

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 90

```

Leu Ala Ser Asn Arg Glu Val Arg Gly Pro Gly Pro Gly Thr Pro Arg
1           5           10           15
Asn Arg Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu
20           25           30
Pro Ala Ser Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr
35           40           45
Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr
50           55           60
Gln Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Gly Pro Leu Ser Arg Leu

```

65		70		75		80									
Pro	Gly	Pro	Val	Ala	Arg	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Ser	Gly	Gln
				85					90					95	
Glu	Leu	Trp	Glu	Val	Arg	Ser	Arg	Ser	Ser	Pro	Ala	Gly	Leu	Pro	Val
			100					105					110		
His	Ala	Pro	Trp	Ser	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Gly	Val	Arg	Gln	Pro	Glu
		115					120					125			
Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	His	Ser	Trp	Ile	Ser	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	Arg
		130					135				140				
Ala	Phe	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Ala	Gln	Pro	Trp	Phe	Leu	Gln	Gln	Val
145					150					155				160	
Ile	Phe	Ala	Asp	Pro	Val	Arg	Pro	Lys	Asn	Arg	Trp	Arg	Pro	His	Ala
			165						170					175	176

<210> 91

<211> 23

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 91

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ser	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu									
			20			23									

<210> 92

<211> 30

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 92

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ser	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Tyr	Gln	Trp		
			20					25					30		

<210> 93
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 93
 tggataagc acgtggcgag tccccgctat cacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60
 atggggctg 69

<210> 94
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 94
 tggataagc acgtggcgag tccccgctat cacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60
 atggggctgc gccgctcgcc ctaccagtgg 90

<210> 95
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220> Xaa on the 21st position means Met (0)
 <223>

<400> 95
 Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Leu Leu Xaa Gly Leu
 20 23

<210> 96
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 96

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ala	Gly	Leu	Leu	Met	Gly										
			20		22										

<210> 97

<211> 21

<212> PRT

<213> Human

<400> 97

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ala	Gly	Leu	Leu	Met											
			20	21											

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 98

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ala	Gly	Leu	Leu												
			20												

<210> 99

<211> 19

<212> PRT

<213> Human

<400> 99

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
Ala Gly Leu			
19			

<210> 100
<211> 18
<212> PRT
<213> Human

<400> 100
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly
18

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Human

<400> 101
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala
17

<210> 102
<211> 16
<212> PRT
<213> Human

<400> 102
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15 16

<210> 103

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Xaa on the 21st position means Met (0)

<223>

<400> 103

Trp	Tyr	Lys	His	Thr	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5				10						15	
Ala	Gly	Leu	Leu	Xaa	Gly	Leu									
			20			23									

<210> 104

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Xaa on the 21st position means Met (0)

<223>

<400> 104

Trp	Tyr	Lys	His	Val	Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Arg	Ala
1				5				10						15	
Ser	Gly	Leu	Leu	Xaa	Gly	Leu									
			20			23									

<210> 105

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Xaa on the 1st position means Fmoc Trp

<223>

<400> 105

Xaa Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu
 20 23

<210> 106

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Xaa on the 1st position means Ac Trp

<223>

<400> 106

Xaa Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu
 20 23

<210> 107

<211> 22

<212> PRT

<213> Human

<400> 107

Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala
1 5 10 15
Gly Leu Leu Met Gly Leu
 20 22

<210> 108

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 108

His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu
1 5 10 15
Leu Met Gly Leu
20

<210> 109
<211> 15
<212> PRT
<213> Human

<400> 109
Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu
1 5 10 15

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 110
Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu
1 5 9

<210> 111
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220> Xaa on the 1st position means Ac Tyr
<223>

<400> 111
Xaa Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala
1 5 10 15
Gly Leu Leu Met Gly Leu
20 22

<210> 112

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Xaa on the 1st position means DTrp

<223>

<400> 112

Xaa Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

23

<210> 113

<211> 22

<212> PRT

<213> Human

<213> Artificial Sequence

<220> Xaa on the 1st position means 3-Indolepropanoyl Tyr

<223>

<400> 113

Xaa Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala

1

5

10

15

Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

22

<210> 114

<211> 66

<212> DNA

<213> Human

<400> 114

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atgggg 66

<210> 115
<211> 63
<212> DNA
<213> Human

<400> 115
tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atg 63

<210> 116
<211> 60
<212> DNA
<213> Human

<400> 116
tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

<210> 117
<211> 57
<212> DNA
<213> Human

<400> 117
tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctg 57

<210> 118
<211> 54
<212> DNA
<213> Human

<400> 118
tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggc 54

<210> 119

<211> 51

<212> DNA

<213> Human

<400> 119

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc t 51

<210> 120

<211> 48

<212> DNA

<213> Human

<400> 120

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgcc 48

<210> 121

<211> 66

<212> DNA

<213> Human

<400> 121

tacaagcacg tggcgagtcc ccgctaccac acggtgggcc gcgccgctgg cctgctcatg 60
gggctg 66

<210> 122

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 122

cacgtggcga gtccccgcta ccacacggtg ggccgcgccg ctggcctgct catggggctg 60

<210> 123

<211> 45

<212> DNA

<213> Human

<400> 123

cgctaccaca cggtagggccg cgccgctggc ctgctcatgg ggctg

45

<210> 124

<211> 27

<212> DNA

<213> Human

<400> 124

cgcgccgctg gcctgctcat ggggctg

27

<210> 125

<211> 51

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 125

tggtacaagc acacggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc g

51

国際様式 INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON ~~WIPO~~ INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名(名称) 武田薬品工業株式会社
代表者 武田 國男
寄託者 あて名 〒 殿
大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli DH5α/pAKKO-GPR8	(受託番号) FERM BP- 7540
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成13年4月11日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に1欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター International Patent Organism Depositary 名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology センター長 小松 泰彦 Dr. Yasuhiko Komatsu あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号 305-8566) AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan 平成13年(2001) 4月11日	

国際様式 INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ~~ON THE~~ INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 武田薬品工業株式会社
代表者 武田 國男
寄託者 殿
あて名 大阪中央区道修町四丁目1番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli TOP10/pCR2. 1-TOPO Human GPR8 Ligand Precursor	(受託番号) FERM BP- 7544
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 13 年 4 月 11 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター International Patent Organization 名 称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology センター長 小松 泰 Dr. Yasuhiko Komatsu あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号 305-8566) AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan	
平成13年 (2001) 4月11日	

国際様式 INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
REC'D 06 JUL 2001
WIPO[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名(名称) 武田薬品工業株式会社
代表者 武田 國男

寄託者

殿

あて名 千

大阪府中央区道修町四丁目1番1号

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOPO
Porcine GPR8 Ligand Precursor

(受託番号)

FERM BP- 7541

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☒ 科学的性質
☒ 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成13年 4月11日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に1欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organization
名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 小松 泰彦

Dr. Yasuhiko Komatsu

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号 305-8566)

AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

平成13年(2001) 4月11日

国際様式 INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 武田薬品工業株式会社
代衣者 武田 國男
寄託者 あて名 〒 殿
大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOPO
Rat GPR8 Ligand Precursor

(受託番号)

FERM BP- 7543

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
■ 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 13 年 4 月 11 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。
そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organisation
名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 小松 泰雄

Dr. Yasuhiko Komatsu

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号 305-8566)

AIST Tsukuba Central 6-1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi.
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

平成13年(2001) 4月11日

国際様式 INTERNATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名(名称) 武田薬品工業株式会社
代表者 武田 國男 殿
寄託者 あて名 〒
大阪市中央区道修町四丁目1番1号

BUDAPEST TREATY ~~ON THE INTERNATIONAL~~
RECOGNITION ~~OF THE DEPOSIT~~ OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURERECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSITissued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOPO Mouse GPR8 Ligand Precursor	(受託番号) FERM BP- 7542
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成13年 4月11日(原寄託日)に受領した1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター International Patent Organisation 名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology センター長 小松 泰彦 Dr. Yasuhiko Komatsu あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号 305-8566) AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan	
平成13年(2001) 4月11日	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C07K16/18, G01N33/53, G01N33/50,
G01N33/15, C12P21/02, C12P21/08, A61K31/711, A61K38/17,
A01K67/027, A61P1/14, A61P3/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C07K16/18, G01N33/53, G01N33/50,
G01N33/15, C12P21/02, C12P21/08, A61K31/711, A61K38/17,
A01K67/027, A61P1/14, A61P3/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),
EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/12670 A1 (Alcoholism & Drug Addiction Res. Foundation), 11 May, 1995 (11.05.95), & AU 9480560 A & US 5591602 A & EP 726949 A1 & JP 9-50722 A (Claims 12, 14; description, pages 53 to 54; sequence list, sequence Nos. 3, 4)	1, 6, 12-16 19-20, 22, 24, 258, 33-40
A	JP 9-121865 A (Takeda Chem. Ind., Ltd.), 13 May, 1997 (13.05.97), (Family: none) (Fig. 4; Par. Nos. [0085] to [0087])	1-28, 31-40
PX	WO 00/22129 A1 (Arena Pharm. Inc.), 20 April, 2000 (20.04.00), & AU 9964307 A (Claims; sequence list, sequence Nos. 15, 16; description, page 30)	1, 6, 12-16, 19-20, 22, 24, 25, 33-40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<ul style="list-style-type: none"> • Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 	<ul style="list-style-type: none"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
10 July, 2001 (10.07.01)

Date of mailing of the international search report
17 July, 2001 (17.07.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05257

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	O'DOWD B. F. et al., "The Cloning and Chromosomal Mapping of Two Novel Human Opioid-Somatostatin-like Receptor Genes, GPR7 and GPR8, Expressed in Discrete Areas of the Brain", Genomics, (1995), Vol. 28, pages 84 to 91	1-28, 31-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05257

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29, 30
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 29 and 30 pertain to methods for prevention and treatment of diseases concerning appetite and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C07K16/18,
G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15, C12P21/02, C12P21/08,
A61K31/711, A61K38/17, A01K67/027, A61P1/14, A61P3/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C07K16/18,
G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15, C12P21/02, C12P21/08,
A61K31/711, A61K38/17, A01K67/027, A61P1/14, A61P3/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
MEDLINE (STN),
EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 95/12670, A1 (ALCOHOLISM & DRUG ADDICTION RES. FOUND.) 11. 5月. 1995 (11. 05. 95) & AU 9480560 A & US 5591602 A & EP, 726949 A1 & JP 9-50722 A (請求項12, 14, 明細書第53-54頁、 配列表配列番号3, 4参照)	1, 6, 12-16, 19-20, 22, 24, 25, 33-40
A	JP 9-121865 A (武田薬品工業株式会社) 13. 5月. 1997 (13. 05. 97) (ファミリー無し) (第4図, 【0085】 ~ 【0087】 欄参照)	1-28, 31-40

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 07. 01

国際調査報告の発送日

17.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
上條 肇



4B 9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO 00/22129 A1 (ARENA PHARM. INC.) 20. 4月. 2000 (20. 04. 00) & AU 9964307 A (請求の範囲、配列表配列番号15, 16、明細書第30頁)	1, 6, 12-16, 19-20, 22, 24, 25, 33-40
A	O'DOWD B. F. <i>et al.</i> , "The Cloning and Chromosomal Mapping of Two Novel Human Opioid-Somatostatin-like Receptor Genes, GPR7 and GPR8, Expressed in Discrete Areas of the Brain", Genomics, (1995) Vol. 28, p. 84-91	1-28, 31-40

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 29, 30 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 29, 30に係る発明は食欲に関する疾患の予防・治療方法に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。